

特許協力条約に基づく国際出願願書
原本（出願用） - 印刷日時 2003年08月08日 (08.08.2003) 金曜日 09時39分24秒

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	

0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際 出願願書は、 0-4-1 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.07.2003)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許 協力条約に従って処理されるこ とを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理 官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	A31454A
I	発明の名称	炎症性疾患の判定方法
II	出願人	出願人である (applicant only)
II-1	この欄に記載した者は	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-2	右の指定国についての出願人で ある。	理化学研究所
II-4ja	名称	RIKEN
II-4en	Name	351-0198 日本国
II-5ja	あて名:	埼玉県 和光市
		広沢 2 番 1 号
II-5en	Address:	2-1, Hirosawa
		Wako-shi, Saitama 351-0198
		Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-1	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-1	この欄に記載した者は	JP US
III-1-2	右の指定国についての出願人で ある。	田中 敏博
III-1-4j	氏名 (姓名)	TANAKA, Toshihiro
III-1-4e	Name (LAST, First)	153-0062 日本国
III-1-5j	あて名:	東京都 目黒区
		三田 1 - 5 - 6 - 8 0 1
III-1-5e	Address:	1-5-6-801, Mita
		Meguro-ku, Tokyo 153-0062
		Japan
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2003年08月08日 (08.08.2003) 金曜日 09時39分24秒

III-2 III-2-1 III-2-2 III-2-4j a III-2-4e n III-2-5j a III-2-5e n III-2-6 III-2-7	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名: Address: 国籍(国名) 住所(国名)	出願人及び発明者である (applicant and inventor) JP US 大西 洋三 OHNISHI, Yozo 152-0023 日本国 東京都 目黒区 八雲 3-29-13-2号 3-29-13-2, Yakumo Meguro-ku, Tokyo 152-0023 Japan 日本国 JP 日本国 JP
III-3 III-3-1 III-3-2 III-3-4j a III-3-4e n III-3-5j a III-3-5e n III-3-6 III-3-7	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名: Address: 国籍(国名) 住所(国名)	出願人及び発明者である (applicant and inventor) JP US 尾崎 浩一 OZAKI, Koichi 150-0013 日本国 東京都 渋谷区 恵比寿 3-36-13-307 3-36-13-307, Ebisu Shibuya-ku, Tokyo 150-0013 Japan 日本国 JP 日本国 JP
III-4 III-4-1 III-4-2 III-4-4j a III-4-4e n III-4-5j a III-4-5e n III-4-6 III-4-7	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名: Address: 国籍(国名) 住所(国名)	出願人及び発明者である (applicant and inventor) JP US 飯田 有俊 IIDA, Aritoshi 211-0014 日本国 神奈川県 川崎市 中原区 田尻町 21 21, Tajiri-cho Nakahara-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 211-0014 Japan 日本国 JP 日本国 JP

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2003年08月08日 (08.08.2003) 金曜日 09時39分24秒

III-5	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-5-1	この欄に記載した者は	米国のみ (US only)
III-5-2	右の指定国についての出願人である。	
III-5-4j	氏名 (姓名)	中村 祐輔
III-5-4e	Name (LAST, First)	NAKAMURA, Yusuke
III-5-5j	あて名:	225-0011 日本国 神奈川県 横浜市 青葉区 あざみ野 1-17-33
III-5-5e	Address:	1-17-33, Azamino Aoba-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 225-0011 Japan
III-5-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-5-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-6	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-6-1	この欄に記載した者は	JP US
III-6-2	右の指定国についての出願人である。	
III-6-4j	氏名 (姓名)	堀 正二
III-6-4e	Name (LAST, First)	HORI, Masatsugu
III-6-5j	あて名:	565-0871 日本国 大阪府 吹田市 山田丘 2-2 大阪大学大学院病態情報内科学内 c/o DEPARTMENT OF INTERNAL MEDICINE AND THERAPEUTICS, OSAKA UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF MEDICINE 2-2, Yamadaoka Suita-shi, Osaka 565-0871 Japan
III-6-5e	Address:	
III-6-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-6-7	住所 (国名)	日本国 JP
IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja	名称	特許業務法人特許事務所サイクス
IV-1-1en	Name	SIKs & Co.
IV-1-2ja	あて名:	104-0031 日本国 東京都 中央区 京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階
IV-1-2en	Address:	8th Floor, Kyobashi-Nisshoku Bldg., 8-7, Kyobashi 1-chome Chuo-ku, Tokyo 104-0031 Japan
IV-1-3	電話番号	03-3538-5680
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-3538-5686

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2003年08月08日 (08.08.2003) 金曜日 09時39分24秒

V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である 他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国であ る他の国 EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国であ る他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権機構と特許協力条約の締約国 である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて 、規則4.9(b)の規定に基づき、 特許協力条約のもとで認められ る他の全ての国の指定を行う。 ただし、V-6欄に示した国の指 定を除く。出願人は、これらの 追加される指定が確認を条件と していること、並びに優先日か ら15月が経過する前にその確認 がなされない指定は、この期間 の経過時に、出願人によって取 り下げられたものとみなされる ことを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主 張	
VI-1-1	出願日	2002年08月08日 (08.08.2002)
VI-1-2	出願番号	特願2002-231532
VI-1-3	国名	日本国 JP
VI-2	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の 番号のものについては、出願書 類の認証謄本を作成し国際事務 局へ送付することを、受理官庁 に対して請求している。	VI-1
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2003年08月08日（08.08.2003）金曜日 09時39分24秒

		申立て数	
VIII	申立て		
VIII-1	発明者の特定に関する申立て	-	
VIII-2	出願し及び特許を与えられる国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-3	先の出願の優先権を主張する国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-4	発明者である旨の申立て（米国を指定国とする場合）	-	
VIII-5	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て	-	
		用紙の枚数	添付された電子データ
IX	照合欄		
IX-1	願書（申立てを含む）	6	-
IX-2	明細書（配列表を除く）	31	-
IX-3	請求の範囲	6	EZABST00.TXT
IX-4	要約	1	-
IX-5	図面	6	-
IX-7a	国際出願に含まれる用紙の枚数（明細書の配列表を除く）	50	-
IX-6	明細書の配列表	13	-
IX-7	合計	63	-
		添付	添付された電子データ
IX-8	添付書類		-
IX-16	手数料計算用紙	✓	-
IX-16	コンピュータ読み取り可能なヌクレオチド又はアミノ酸配列表		1 フレキシブルディスク
IX-16(i)	規則13の3に基づき提出する国際調査のための写し（国際出願の一部を構成しない）	-	フレキシブルディスク
IX-17	PCT-EASYディスク	-	-
IX-18	その他	陳述書	-
IX-18	その他	フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面	-
IX-18	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
IX-18	その他	国際事務局の口座への振込みを証明する書面	-
IX-19	要約書とともに提示する図の番号		
IX-20	国際出願の使用言語名	日本語	
X-1	出願人、代理人又は代表者の記名押印		
X-1-1	名称	特許業務法人特許事務所サイクス	



受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面：	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2003年08月08日（08.08.2003）金曜日 09時39分24秒

10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であつてその後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

PCT手数料計算用紙(願書付属書)

原本(出願用) - 印刷日時 2003年08月08日 (08.08.2003) 金曜日 09時39分24秒

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

0	受理官庁記入欄			
0-1	国際出願番号			
0-2	受理官庁の日付印			
0-4	様式-PCT/RO/101 (付属書) このPCT手数料計算用紙は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.07.2003)		
0-4-1				
0-9	出願人又は代理人の書類記号	A31454A		
2	出願人	理化学研究所		
12	所定の手数料の計算	金額/係数	小計 (JPY)	
12-1	送付手数料 T	⇒	18,000	
12-2-1	調査手数料 S	⇒	72,000	
12-2-2	国際調査機関	JP		
12-3	国際手数料			
	基本手数料 (最初の30枚まで) b1	54,000		
12-4	30枚を越える用紙の枚数	33		
12-5	用紙1枚の手数料 (X)	1,200		
12-6	合計の手数料 b2	39,600		
12-7	b1 + b2 = B	93,600		
12-8	指定手数料			
	国際出願に含まれる指定国 数	96		
12-9	支払うべき指定手数料の数 (上限は5)	5		
12-10	1指定当たりの手数料 (X)	11,600		
12-11	合計の指定手数料 D	58,000		
12-12	PCT-EASYによる料金の減 額 R	-16,600		
12-13	国際手数料の合計 (B+D-R) I	⇒	135,000	
12-14	優先権証明書請求手数料			
	優先権証明書を請求した数	1		
12-15	1優先権証明書当たり の手数料 (X)	1,400		
12-16	優先権証明書請求手数料の 合計 P	⇒	1,400	
12-17	納付すべき手数料の合計 (T+S+I+P)	⇒	226,400	
12-19	支払方法	送付手数料: 特許印紙 調査手数料: 特許印紙 国際手数料: 銀行口座への振込み 優先権証明書請求手数料: 特許印紙		

EASYによるチェック結果と出願人による言及

13-1-1	出願人による言及 氏名(名称)	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
--------	--------------------	---------------------------

PCT手数料計算用紙(願書付属書)

原本(出願用) - 印刷日時 2003年08月08日 (08.08.2003) 金曜日 09時39分24秒

13-2-2	EASYによるチェック結果 指定国	Green? より多くの指定が可能です。(以下の国が指定からは ずされています: KP) 確認してください。
13-2-3	EASYによるチェック結果 氏名(名称)	Green? 出願人 1: 電話番号が記入されていません。
		Green? 出願人 1: ファクシミリ番号が記入されていません。
		Green? 代理人 1: 英文表記での名称はできるだけ大文字で記入してくだ さい。
13-2-7	EASYによるチェック結果 内訳	Yellow! すべての出願人が願書に署名(記名押印)をしない限り 、委任状又は包括委任状の写しを添付する必要があります。
		Green? 要約書とともに提示する図の番号が示されていません 。
13-2-10	EASYによるチェック結果 注釈	Green? 願書に署名する者の氏名及び署名を行う者の権限のい ずれか一方又は両方が記載されていません。受理官庁 によっては、提出者の記名押印とともに、これらの情 報の記載を要求している場合がありますのでご注意下 さい。
		Green? 願書に表示しなければならない通常の項目はすべて他 のPCT-EASYの機能で入力することができます。言及を 用いた表示の有効性について確認してください。
13-2-11	EASYによるチェック結果 受理官庁/国際事務局記入欄	Green? この願書を作成したPCT-EASYは英語版ないし西欧言語 版以外のWindows上で動作しています。ASCII文字以外 の文字について、願書と電子データを注意して比較し てください。

明細書

炎症性疾患の判定方法

技術分野

本発明はLT- α 遺伝子等に存在する遺伝子多型を検出することを含む炎症性疾患の判定方法、該方法に使用されるオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドを含む炎症性疾患診断用キット、並びにそれらの利用に関する。本発明はさらに、LT- α を利用した、炎症性疾患の治療方法及び炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法にも関する。

背景技術

ライフスタイルの変化及び新しい薬理学的アプローチにも関わらず、心筋梗塞を含む冠動脈疾患は多くの国々において主要な死亡原因となっている(Breslow, J. L., Nature Med. 3, 600-601, 1997; Braunwald, E., N. Engl. J. Med., 337, 1360-1369, 1997)。従って、それらの発症における遺伝的及び環境的因子を同定することが強く望まれている。

共通の遺伝的変異は、糖尿病や高血圧症などの生活習慣病に罹患する危険性と顕著に関連していることが知られている(Risch, N., et al., Science, 273, 1516-1517, 1996; Collins, F. S., et al., Science, 278, 1580-1581, 1997; Lander, E. S., et al., Science, 274, 536-539, 1996)。多遺伝子性疾患の感受性遺伝子を同定するには、「連鎖」を利用する方法と、「関連」を利用する方法がある。連鎖解析では、疾患感受性遺伝子の座位と遺伝マーカー（主としてマイクロサテライト）の座位が連鎖しているかを検出する、すなわち遺伝子座位間の関係を調べるのに対して、関連解析では特定の遺伝マーカー（主として一塩基多型：SNP）のどの型（アレル：対立遺伝子）が疾患と関連しているかを検出する、つまり対立遺伝子間の関係を調べる。従って、共通の変異をマーカーとして用いる関連解析は疾患関連遺伝子の局在に対する連鎖解析のよりもずっと強力といえる。一塩

基多型 (SNPs) は、疾患易罹患性や薬剤反応性に関連する遺伝子を探索する際の有用な多型マーカーとなる。SNPs は、遺伝子産物の質や量に直接影響を与えたり、ある疾患や薬剤による重篤な副作用に対する危険性を増やすことがある。よって、多くのSNPsを探索することにより、疾患関連遺伝子の同定や薬剤による副作用を避ける診断方法の確立に寄与できることを期待される。

ヒト染色体 6 p 2 1 上の約 1 3 0 k b の領域には、リンホトキシン- α (LT- α)、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、LST1、1C7、アログラフト炎症因子-1 (AIF-1: allograft inflammatory-factor-1)、I kappa B-like protein (IKBL)、V-ATPase G-subunit like protein(ATP6G)、BAT1、MICB及びp5-1が存在している。LT- α (TNF- β としても知られる) は血管炎症過程の最初の段階に生産されるサイトカインの一つで、 β シート構造がサンドイッチ状に重なったホモトリマー構造をとり、インターロイキン-1及び接着分子のような他のメディエーターを誘導することによってサイトカインカスケードを活性する(Ross, R., N. Engl. J. Med., 340, 115-126, 1999)。サイトカインのような炎症メディエーターは、アテローム形成やアテローム性損傷に関与し、管腔内血栓を誘導することが知られている(Ross, R., N. Engl. J. Med., 340, 115-126, 1999)。IKBLは主要組織親和性複合体(NHC) クラスII領域において6 p 2 1. 3に位置している。IKBLはB細胞における κ 軽鎖遺伝子のインヒビター(IKB)ファミリータンパク質に類似していると報告されている。IKBファミリーのタンパク質はB細胞内における κ 軽鎖遺伝子エンハンサーの核因子を阻害する作用を有する。

遺伝子変異と心筋梗塞との関係については、これまでヒトプロスタサイクリン合成酵素遺伝子の多型を分析して心筋梗塞の遺伝的要因を判定する方法(特開2002-136291号公報)などがある。しかしながら、上記の6 p 2 1 上の約1 3 0 k b の領域に存在する遺伝子変異と心筋梗塞との関連についてはこれまで報告はない。

発明の開示

本発明の課題は、心筋梗塞と関連性のある遺伝子多型を同定し、その遺伝子多型を利用して心筋梗塞をはじめとする炎症性疾患を判定する方法、該方法に用いることのできるオリゴヌクレオチド、炎症性疾患診断用キット、並びに炎症性疾患の治療方法などを提供することにある。

本発明者らは上記の課題を解決すべくヒトLT- α 、IKBL、及びBAT1遺伝子内のSNPsをそれぞれ約1,000人の心筋梗塞患者群と対照群についてマルチプレックスPCR-インベード法によりタイピングし、患者-対照研究(case-control study)による関連解析を行った結果、これらのSNPsの頻度が統計学的に有意に心筋梗塞患者で多いことを同定した。さらに、ルシフェラーゼアッセイ法、リコンビナントプロテインを用いた実験により、これらのSNPsが該遺伝子の転写活性に影響を与え、その結果遺伝子産物量が変化し、この変化が心筋梗塞等の疾患を引き起こす可能性を見出した。本発明はかかる知見により完成されたものである。

すなわち、本発明によれば、リンホトキシン- α (LT- α) 遺伝子、IKBL-like (IKBL) 遺伝子、及びBAT1遺伝子より成る群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子に存在する少なくとも一種の遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

すなわち、本発明によれば、リンホトキシン- α (LT- α) 遺伝子、IKBL-like (IKBL) 遺伝子、及びBAT1遺伝子より成る群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子に存在する少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

本発明によればまた、下記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

(1) 配列番号1に示すLT- α 遺伝子のエクソン1の塩基配列の10番目の塩基におけるG/Aの多型

(2) 配列番号2に示すLT- α 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基におけるA/Gの多型

(3) 配列番号3に示すLT- α 遺伝子のエキソン3の塩基配列の81番目の塩基におけるC/Aの多型

(4) 配列番号4に示すIKBL遺伝子のプロモーターの塩基配列の572番目の塩基におけるT/Aの多型

(5) 配列番号5に示すBAT1遺伝子のプロモーターの塩基配列の1228番目の塩基におけるG/Cの多型

本発明によればまた、配列番号3に示すLT- α 遺伝子のエキソン3の塩基配列の80番目から82番目の塩基の少なくとも一つが他の塩基に置換されることによって、コードされるアミノ酸がスレオニンからアスパラギンに変異する遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

本発明によればまた、配列番号1から5に示される配列における、前記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも1つの部位を含む連続する少なくとも10塩基の配列、又はその相補配列にハイブリダイズすることができ、前記判定方法においてプローブとして用いるオリゴヌクレオチドが提供される。

(1) 配列番号1に示すLT- α 遺伝子のエキソン1の塩基配列の10番目の部位

(2) 配列番号2に示すLT- α 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目部位

(3) 配列番号3に示すLT- α 遺伝子のエキソン3の塩基配列の81番目の部位

(4) 配列番号4に示すIKBL遺伝子のプロモーターの塩基配列の572番目の部位

(5) 配列番号5に示すBAT1遺伝子のプロモーターの塩基配列の1228番目の部位

本発明によればまた、配列番号1から5に示される配列における、前記の(1)

から（５）よりなる群から選ばれる少なくとも１つの部位を含む連続する少なくとも１０塩基の配列、及び／又はその相補配列を増幅することができ、前記判定方法においてプライマーとして用いるオリゴヌクレオチドが提供される。

（１） 配列番号１に示すLT- α 遺伝子のエクソン１の塩基配列の１０番目の部位

（２） 配列番号２に示すLT- α 遺伝子のイントロン１の塩基配列の９０番目の部位

（３） 配列番号３に示すLT- α 遺伝子のエクソン３の塩基配列の８１番目の部位

（４） 配列番号４に示すIKBL遺伝子のプロモーターの塩基配列の５７２番目の部位

（５） 配列番号５に示すBAT１遺伝子のプロモーターの塩基配列の１２２８番目の部位

さらに、本発明によれば、上記のオリゴヌクレチドの１種以上を含む、炎症性疾患診断用キットが提供される。

本発明の別の側面によれば、前記の（１）から（５）よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、LT- α 、IKBL、又はBAT１の発現状態の分析方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、前記の（１）から（５）よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含むLT- α 、IKBL、又はBAT１遺伝子断片を細胞に導入し、該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することを含む、LT- α 、IKBL、又はBAT１の転写活性の測定方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、前記の（１）から（５）よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含むLT- α 、IKBL、又はBAT１遺伝子断片を細胞に導入し、LT- α 、IKBL、又はBAT１の転写活性を阻害する候補物質の存在下で該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することを含む、LT- α 、IKBL、又はBAT１の転写活性阻害物質のスクリーニング方法が提

供される。

本発明の好ましい態様によれば、前記LT- α 、IKBL、又はBAT1遺伝子断片の下流にリポーター遺伝子を結合させた転写ユニットを細胞に導入し、該細胞を培養し、リポーター活性を測定することによって該遺伝子の発現を分析する、上記いずれかの方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、前記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含む遺伝子断片とLT- α 、IKBL、又はBAT1の転写制御因子の存在が予想される試料を接触させ、上記断片と転写制御因子との結合を検出することを含む、LT- α の転写制御因子のスクリーニング方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、配列番号2に示すLT- α 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基におけるC/Aの多型を含む遺伝子断片を接着分子誘導性細胞に導入し、該細胞の接着分子の誘導化能を評価する方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、リンホトキシン- α (LT- α)の発現又は活性を抑制することを含む、炎症性疾患の治療方法が提供される。好ましくは、炎症性疾患は心筋梗塞である。上記方法において好ましくは、リンホトキシン- α (LT- α)に対する抗体を用いる。

本発明のさらに別の側面によれば、リンホトキシン- α (LT- α)の発現又は活性を抑制する物質を有効成分として含む、炎症性疾患の治療薬が提供される。好ましくは、リンホトキシン- α (LT- α)の発現又は活性を抑制する物質は、リンホトキシン- α に対する抗体である。

本発明のさらに別の側面によれば、細胞と候補物質とを接触させる工程、細胞内におけるリンホトキシン- α (LT- α)をコードする遺伝子の発現量を分析する工程、及び候補物質の非存在下の条件と比較して当該遺伝子の発現量を低下させる候補物質を炎症性疾患の治療薬として選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、リンホトキシン- α (LT- α) と候補物質とを接触させる工程、リンホトキシン- α の活性を測定する工程、及び候補物質の非存在下の条件と比較してリンホトキシン- α の活性を低下させる候補物質を炎症性疾患の治療薬として選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法が提供される。好ましくは、リンホトキシン- α の活性は、接着分子及び／又はサイトカインを誘導する活性である。好ましくは、接着分子は、VCAM-1、ICAM-1又はE-セレクトインであり、サイトカインはTNFである。

本発明の一例によれば、リンホトキシン- α (LT- α) の発現量又は活性の低下は、IKBL遺伝子の発現量又は活性の増加を介したものである。

図面の簡単な説明

図1は、LT- α 遺伝子座を含む130kbのゲノム領域における連鎖不平衡を示す。

上：各遺伝子におけるゲノタイプされたSNP'sの数を表す転写マップ。

下：本領域におけるD'の分布。D'はLT- α のイントロン1内のSNP対他のSNPで示す。

図2(A)はLT- α のイントロン1 (252A>G)、図2(B)はIKBLのプロモーター領域 (-63T>A) 内のSNPによる転写制御活性をそれぞれ示す。*10G-252Aと10A-252Gとの間の比較において $p < 0.01$: ** -63Aアレルと-63Tアレル間の比較において $p < 0.01$ (student's t test)。

図3は、LT- α のイントロン1に対する未知の核因子の結合を示す。矢印は核因子のG-アレルに対するより強い結合を示すバンドである。

図4(A)は、HCASMCのみを培養した場合(白色バー)、HCASMCを26T-LT- α (灰色バー) 又は26N-LT- α (黒色バー) (5 ng/ml) を用いて4時間処理して培養した場合のVCAM-1の相対的なmRNA発現量をそれぞれ示す。図4(B)は、HCASMCのみを培養した場合(白色バー)、H

CASMCを26T-LT- α （灰色バー）又は26N-LT- α （黒色バー）（5 ng/ml）を用いて4時間処理して培養した場合のE-セレクチンの相対的なmRNA発現量を示す。結果は平均値 \pm S.D.（n=3、*p<0.01、**p<0.05 対26T）を示す。

図5は、ヒト冠動脈血管内皮細胞（HCAEC）におけるLT- α （26Asn）（26N）のTNF誘導活性及びSelectinE誘導活性（相対的なmRNA発現量）について、LT- α （26Thr）（26T）の場合と比較した結果を示す。結果は平均値 \pm S.D.（*p<0.01、**p<0.05 対26T）を示す。

図6は、血球系細胞株（HL-60）におけるLT- α （26Asn）（26N）のTNF誘導活性及びICAM1誘導活性（相対的なmRNA発現量）について、LT- α （26Thr）（26T）の場合と比較した結果を示す。結果は平均値 \pm S.D.（*p<0.01 対26T）を示す。

発明を実施するための最良の形態

[1] 炎症性疾患の判定方法

本発明の方法は、炎症性疾患と関連性を示す特定遺伝子に存在する遺伝子多型、特には一塩基多型（SNPs）を検出することによって、炎症性疾患の発症の有無、あるいは炎症性疾患の発症の可能性を判定する方法である。

上記の特定遺伝子とは、ヒト染色体6p21上の約130kbの領域に存在するリンホトキシン- α （LT- α ）遺伝子（配列番号6）、I Kappa B-like（IKBL）遺伝子（配列番号7）、及びBAT1遺伝子（配列番号8）より成る群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子であって、遺伝子多型は、これらの遺伝子を含むゲノムDNAのエキソン、イントロン、プロモーター部分に存在する。

本発明において「リンホトキシン- α （LT- α ）遺伝子、I Kappa B-like（IKBL）遺伝子、及びBAT1遺伝子より成る群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子に存在する遺伝子多型（一塩基多型など）を検出する」とは、(i)当該遺伝子多型（遺伝子側多型と称する）を直接検出すること、及び(ii)前記遺伝子

の相補配列側に存在する遺伝子多型（相補側多型と称する）を検出し、その検出結果から遺伝子側多型を推定することの双方を指すものとする。ただし、遺伝子側の塩基と相補配列側の塩基とが完全に相補的な関係にあるとは限らないという理由から、遺伝子側多型を直接検出することがより好ましい。

なお、本発明において検出対象となる相補側多型としては、リンホトキシン- α （LT- α ）遺伝子の相補配列、I Kappa B-like（IKBL）遺伝子の相補配列、及びBAT1遺伝子の相補配列から選ばれる少なくとも一つの相補配列に存在する遺伝子多型が挙げられ、より具体的には、下記の（１）から（５）よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型が挙げられる。

をいう。

（１）LT- α 遺伝子の相補配列における、配列番号１に示すLT- α 遺伝子のエキソン１の塩基配列の１０番目の塩基に相補的な塩基のC/Tの多型

（２）LT- α 遺伝子の相補配列における、配列番号２に示すLT- α 遺伝子のイントロン１の塩基配列の９０番目の塩基に相補的な塩基のT/Cの多型

（３）LT- α 遺伝子の相補配列における、配列番号３に示すLT- α 遺伝子のエキソン３の塩基配列の８１番目の塩基に相補的な塩基のG/Tの多型

（４）IKBL 遺伝子の相補配列における、配列番号４に示すIKBL 遺伝子のプロモーターの塩基配列の５７２番目の塩基に相補的な塩基のA/Tの多型

（５）BAT1 遺伝子の相補配列における、配列番号５に示すBAT1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の１２２８番目の塩基に相補的な塩基のC/Gの多型

本明細書において、遺伝子（例えばLT- α 遺伝子）におけるX番目の塩基をその位置を示す数字Xと、塩基を表す記号との組み合わせで示す場合がある。例えば、「１０G」とは、１０番目の位置にあるGを示し、「１０A」とは、１０番目の位置にあるAを示し、「１０G/A」とは、１０番目の位置にあるG又はAを示す。

本明細書において配列番号２に示すLT- α 遺伝子のイントロン１の塩基配列の９０番目の塩基は、LT- α 遺伝子のエキソン１の１番目から数えて２５２番目

の塩基に相当する。また、配列番号3に示すLT- α 遺伝子のエキソン3の塩基配列の81番目の塩基は、LT- α 遺伝子のエキソン1の1番目の塩基から数えて723番目の塩基に相当する。

従って、本明細書において配列番号2に示すLT- α 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基におけるG/A多型は、LT- α イントロン1 252 G/Aと、また配列番号3に示すLT- α 遺伝子のエキソン3の塩基配列の81番目の塩基におけるC/Aの多型は、LT- α エキソン3 723 C/Aと表現する場合がある。

本明細書において配列番号4に示すIKBL遺伝子のプロモーターの塩基配列の572番目の塩基は、634番目の塩基を1番とした場合に下流方向に向かって63番目（-63番目）の塩基に相当する。また、配列番号5に示すBAT1遺伝子のプロモーターの塩基配列の1228番目の塩基は、1250番目の塩基を1番とした場合に下流方向に向かって23番目（-23番目）に相当する。

従って、本明細書において配列番号4に示すIKBL遺伝子のプロモーターの塩基配列の572番目の塩基におけるT/Aの多型は、IKBLプロモーター-63 T/Aと、また配列番号5に示すBAT1遺伝子のプロモーターの塩基配列の1228番目の塩基におけるG/Cの多型は、BAT1プロモーター -23 G/Cと表現する場合がある。

例えば、後記表1に示すように、配列番号1に示すLT- α 遺伝子のエキソン1の塩基配列の10番目の塩基がGである場合（LT- α エキソン1 10 G）、配列番号2に示すLT- α 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基がAである場合（LT- α イントロン1 252 A）、配列番号3に示すLT- α 遺伝子のエキソン3の塩基配列の81番目の塩基がCである場合（LT- α エキソン3 723 C）、配列番号4に示すIKBL遺伝子のプロモーターの塩基配列の572番目の塩基がAである場合（IKBLプロモーター -63 A）、配列番号5に示すBAT1遺伝子のプロモーターの塩基配列の1228番目の塩基がGである場合（BAT1プロモーター -23 G）は、炎症性疾患が発症してい

る、あるいは発症の可能性が高いと判定できる。

これに対し、配列番号1に示すLT- α 遺伝子のエキソン1の塩基配列の10番目の塩基がAである場合（LT- α エキソン1 10A）、配列番号2に示すLT- α 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基がGである場合（LT- α イントロン1 252G）、配列番号3に示すLT- α 遺伝子のエキソン3の塩基配列の81番目の塩基がAである場合（LT- α エキソン3 723A）、配列番号4に示すIKBL遺伝子のプロモーターの塩基配列の572番目の塩基がTである場合（IKBLプロモーター -63T）、配列番号5に示すBAT1遺伝子のプロモーターの塩基配列の1228番目の塩基がCである場合（BAT1プロモーター -23C）は、炎症性疾患が発症していない、あるいは発症の可能性が低いと判定できる。

また、配列番号1に示すLT- α 遺伝子のエキソン1の塩基配列の10番目の塩基と配列番号2に示すLT- α 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基（エキソン1の1番目の塩基から数えて252番の塩基）の組み合わせの違い（10G-252Aヘテロ接合、10A-252Gヘテロ接合、10A-252Aホモ接合）によってLT- α 発現量が異なる。従って、配列番号1に示すLT- α 遺伝子のエキソン1の塩基配列の10番目の塩基と配列番号2に示すLT- α 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基の組み合わせが、10G-252Aヘテロ接合、10A-252Gヘテロ接合、10A-252Aホモ接合であるかを検出することによっても、炎症性疾患の判定ができる。

例えば後記実施例に示すように、10A-252Gである場合は炎症のシグナルであるLT- α の発現量が有意に多く、炎症性疾患が発症している、あるいは発症の可能性が高いと判定できる。

また、配列番号3に示すLT- α 遺伝子のエキソン3の塩基配列の81番目の塩基におけるC/Aの多型は、エキソン3中の26番目のコドンが変化（ACCからAAC）することによってスレオニンからアスパラギンへのアミノ酸変異をもたらす。例えば後記実施例に示すように、26番目のコドンがアスパラギンをコ

ードする場合（26N）は、スレオニンをコードする場合（26T）より有意にLT- α の発現量が多く、またヒト冠状動脈平滑筋細胞（HCASMC）において細胞接着因子である血管細胞接着分子-1（VCAM-1）やE-セ렉チンを誘導することから炎症性疾患が発症している、あるいは発症の可能性が高いと判定できる。

本明細書において、疾患の「判定」とは疾患発症の有無の判断、疾患発症の可能性の判断（罹患危険性の予想）、疾患の遺伝的要因の解明などをいう。

また、疾患の「判定」は、上記の一塩基多型の検出法による結果と、所望により他の多型分析（VNTRやRFLP）及び／又は他の検査結果と合わせて行うこともできる。

また、本明細書において、「炎症性疾患」とは、炎症性病態との相関が知られている細胞接着因子やサイトカインの誘導が認められる疾患であれば特に限定はされないが、例えば慢性関節リウマチ、全身性エリマトーデス、炎症性腸炎、種々のアレルギー反応、細菌性ショック、心筋梗塞や脳卒中などの動脈硬化性疾患などが挙げられ、特には心筋梗塞が挙げられる。

（検出対象）

遺伝子多型の検出の対象は、ゲノムDNAが好ましいが、場合によっては（つまり多型部位及びその隣接領域の配列がゲノムと同一または完全相補的になっている場合）cDNA、又はmRNAを使用することもできる。また、上記対象を採取する試料としては、任意の生物学的試料、例えば血液、骨髄液、精液、腹腔液、尿等の体液；肝臓等の組織細胞；毛髪等の体毛等が挙げられる。ゲノムDNA等は、これらの試料より常法に従い抽出、精製し、調製することができる。

（増幅）

遺伝子多型を検出するにあたっては、まず遺伝子多型を含む部分を増幅する。増幅は、例えばPCR法によって行われるが、他の公知の増幅方法、例えばNASBA法、LCR法、SDA法、LAMP法等で行ってもよい。

プライマーの選択は、例えば、配列番号1から5に示される配列における、前

記の一塩基多型部位を含む連続する少なくとも10塩基以上、好ましくは10～100塩基、より好ましくは10～50塩基の配列、及び／又はその相補配列を増幅するように行う。

プライマーは、前記の一塩基多型部位を含む所定塩基数の配列を増幅するためのプライマーとして機能し得る限り、その配列において1又はそれ以上の置換、欠失、付加を含んでいてもよい。

増幅のために用いるプライマーは、試料が一の対立遺伝子型の場合にのみ増幅されるようにフォワードプライマー又はリバースプライマーの一方が一塩基多型部位にハイブリダイズするように選択してもよい。プライマーは必要に応じて蛍光物質や放射性物質等により標識することができる。

(遺伝子多型の検出)

遺伝子多型の検出は、一の対立遺伝子型に特異的なプローブとのハイブリダイゼーションにより行うことができる。プローブは、必要に応じて、蛍光物質や放射性物質等の適当な手段により標識してもよい。プローブは、前記の一塩基多型部位を含み、被検試料とハイブリダイズし、採用する検出条件下に検出可能な程度の特異性を与えるものである限り何等限定はない。プローブとしては、例えば配列番号1から5に示す配列における、前記の一塩基多型部位を含む連続する少なくとも10塩基以上、好ましくは10～100塩基の配列、より好ましくは10～50塩基の配列、又はそれらの相補配列にハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチドを用いることができる。また、一塩基多型部位がプローブのほぼ中心部に存在するようにオリゴヌクレオチドを選択するのが好ましい。該オリゴヌクレオチドは、プローブとして機能し得る限り、即ち、目的の対立遺伝子型の配列とハイブリダイズするが、他の対立遺伝子型の配列とはハイブリダイズしない条件下でハイブリダイズする限り、その配列において1又はそれ以上の置換、欠失、付加を含んでいてもよい。また、プローブには、RCA (rolling circle amplification) 法による増幅に用いられる一本鎖プローブ(パドロックプローブ)のように、ゲノムDNAとアニールし、環状になることによって上記のプローブ

の条件を満たすプローブが含まれる。

本発明に用いるハイブリダイゼーション条件は、対立遺伝子型を区別するのに十分な条件である。例えば、試料が一の対立遺伝子型の場合にはハイブリダイズするが、他の対立遺伝子型の場合にはハイブリダイズしないような条件、例えばストリンジেন্টな条件である。ここで、「ストリンジেন্টな条件」としては、例えば、例えば、モレキュラークロニング・ア・ラボラトリーマニュアル第2版 (Sambrook et al., 1989) に記載の条件等が挙げられる。具体的には、例えば、 $6 \times \text{SSC}$ ($1 \times \text{SSC}$ の組成: 0.15 M NaCl 、 0.015 M クエン酸ナトリウム、 $\text{pH } 7.0$)、 $0.5\% \text{ SDS}$ 、 $5 \times$ デンハート及び 100 mg/ml ニシン精子DNAを含む溶液中プローブとともに 65°C で一晩保温するという条件等が挙げられる。

プローブは、一端を基板に固定してDNAチップとして用いることもできる。この場合、DNAチップには、一の対立遺伝子型に対応するプローブのみが固定されていても、両方の対立遺伝子型に対応するプローブが固定されていてもよい。

遺伝子多型の検出は、制限酵素断片長多型分析法 (RFLP: Restriction fragment length polymorphism) により行うこともできる。この方法では、一塩基多型部位がいずれの遺伝子型をとるかによって制限酵素により切断されるか否かが異なってくる制限酵素で試料核酸を消化し、消化物の断片の大きさを調べることにより、該制限酵素で試料核酸が切断されたか否かを調べ、それによって試料の多型を分析する。

遺伝子多型の検出は、増幅産物を直接配列決定することによって行ってもよい (ダイレクトシーケンシング法)。配列決定は、例えばジデオキシ法、Maxam-Gilbert 法等の公知の方法により行うことができる。

遺伝子多型の検出は、インベーターアッセイにより行ってもよい。この方法では、SNP があるかどうかテストする DNA ターゲットフラグメントに対して相補的配列を持つインベーターオリゴと $5'$ のフラップ構造を持ち、SNP を検出するための相補的オリゴ (シグナルプローブ) を使用する。まずターゲット DNA に対し

てインベーターオリゴとシグナルプローブをハイブリダイズさせる。この時、インベーターオリゴとプローブは1塩基がオーバーラップする構造(invasive structure)を持つ。この部分にCleavase (Archaeoglobus fulgidus から分離されたフラップ・エンドヌクレアーゼ) が作用し、SNP 部位のシグナルプローブの塩基とターゲットの塩基が相補的 (SNP なし) の場合にはシグナルプローブの5' フリップが切断される。切断された5' フリップは FRET Probe (Fluorescence resonance energy transfer probe) にハイブリダイズする。FRET プローブ上には蛍光色素とクエンチャー(Quencher)が近接しており、蛍光が抑制されるが、5' フリップDNAが結合することによりCleavaseによって蛍光色素の部分が切断され、蛍光シグナルが検出できる。

遺伝子多型の検出はまた、変性勾配ゲル電気泳動法 (D G G E : denaturing gradient gel electrophoresis)、一本鎖コンフォメーション多型解析 (S S C P : single strand conformation polymorphism)、対立遺伝子特異的 P C R (allele-specific PCR)、A S O (allele-specific oligonucleotide) によるハイブリダイゼーション法、ミスマッチ部位の化学的切断 (C C M : chemical cleavage of mismatches)、H E T (heteroduplex method) 法、P E X (primer extension) 法、R C A (rolling circle amplification) 法等を用いることができる。

[2] 炎症性疾患診断用キット

前記のプライマー又はプローブとしてのオリゴヌクレオチドは、これを含む炎症疾患診断用キットとして提供できる、キットは、上記遺伝子多型の分析法に使用される制限酵素、ポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸、標識、緩衝液等を含んでいてもよい。

[3] L T- α 、I K B L、又はB A T 1の発現状態の分析方法

本発明によればまた、前記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を検出することによって、L T- α 、I K B L、又はB A T

1 の発現状態を分析することができる。

例えば、配列番号 1 に示す LT- α 遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の塩基が A で、配列番号 2 に示す LT- α 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の塩基（エキソン 1 の 1 番目の塩基から数えて 252 番の塩基）が G である場合（10A-252G ハプロタイプ）は、LT- α の発現量が多いと判断できる。これに対し、配列番号 1 に示す LT- α 遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の塩基が G で、配列番号 2 に示す LT- α 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の塩基（エキソン 1 の 1 番目の塩基から数えて 252 番の塩基）が A である場合（10G-252A ハプロタイプ）、配列番号 1 に示す LT- α 遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の塩基が A で、配列番号 2 に示す LT- α 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の塩基（エキソン 1 の 1 番目の塩基から数えて 252 番の塩基）が A である場合（10A-252A ハプロタイプ）は、LT- α の発現量が少ないと判断できる。

[4] LT- α 、IKBL、又は BAT1 の転写活性の測定方法

本発明によればまた、前記の（1）から（5）よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含む LT- α 、IKBL、又は BAT1 遺伝子断片を細胞に導入し、該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することによって LT- α 、IKBL、又は BAT1 の転写活性を測定することができる。

本発明の好ましい態様によれば、前記 LT- α 、IKBL、又は BAT1 遺伝子断片の下流にリポーター遺伝子を結合させた転写ユニットを細胞に導入し、該細胞を培養し、リポーター活性を測定することによって該遺伝子の発現を分析する。

例えば、一塩基多型がプロモーター部位に存在する場合は、その一塩基多型を含む遺伝子の下流にレポーター遺伝子を挿入した系を導入した細胞を培養し、レポーター活性を測定すれば、一塩基多型による転写効率に違いを測定することができる。

ここでリポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコール、

アセチルトランスフェラーゼ、ガラクトシダーゼなどの遺伝子が用いられる。

[5] LT- α 、IKBL、又はBAT1の転写活性阻害物質のスクリーニング方法

本発明においては、前記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含むLT- α 、IKBL、又はBAT1遺伝子断片を細胞に導入し、LT- α 、IKBL、又はBAT1の転写活性を阻害する候補物質の存在下で該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することによってLT- α 、IKBL、又はBAT1転写活性阻害物質をスクリーニングすることができる。

本発明の好ましい態様によれば、前記LT- α 、IKBL、又はBAT1遺伝子断片の下流にリポーター遺伝子を結合させた転写ユニットを細胞に導入し、該細胞を培養し、リポーター活性を測定することによって該遺伝子の発現を分析する。

例えば、LT- α の発現量が有意に高いことが認められる一塩基多型(例えば上記10A-252Gハプロタイプ)を有する遺伝子の下流にレポーター遺伝子を挿入した系を導入した細胞を候補物質の存在下又は非存在下の両方の場合について培養し、候補物質の存在下で培養を行った場合にレポーター活性が下がれば、その候補物質はLT- α 転写活性阻害物質として選択することができる。

ここでリポーター遺伝子としては、上記に挙げた遺伝子が用いられる。

候補物質としては任意の物質を使用することができる。候補物質の種類は特に限定されず、個々の低分子合成化合物でもよいし、天然物抽出物中に存在する化合物でもよく、あるいは化合物ライブラリー、ファージディスプレイライブラリー、コンビナトリアルライブラリーでもよい。候補物質は、好ましくは低分子化合物であり、低分子化合物の化合物ライブラリーが好ましい。化合物ライブラリーの構築は当業者に公知であり、また市販の化合物ライブラリーを使用することもできる。

上記のスクリーニング法により得られるLT- α 、IKBL、又はBAT1の転写活性阻害物質もまた本発明の範囲内である。このようなLT- α 、IKBL、又

はBAT1の転写活性阻害物質は、心筋梗塞治療剤、抗炎症剤、免疫抑制剤などの各種薬剤の候補物質として有用である。

[6] LT- α 転写制御因子のスクリーニング方法

本発明においてはまた、前記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含む遺伝子断片とLT- α 、IKBL、又はBAT1の転写制御因子の存在が予想される試料を接触させ、上記断片と転写制御因子との結合を検出することによって、LT- α 、IKBL、又はBAT1の転写制御因子をスクリーニングすることができる。前記の一塩基多型を含む遺伝子断片とLT- α 、IKBL、又はBAT1の転写制御因子の存在が予想される物質との結合の検出は、ゲルシフト法（電気泳動移動度シフト解析： electrophoretic mobility shift assay, EMSA）、DNase I フットプリント法等によって行うことができるが、ゲルシフト法が好ましい。ゲルシフト法では、タンパク質（転写制御因子）が結合すると、分子サイズが大きくなり電気泳動におけるDNAの移動度が低下するので、 ^{32}P で標識した遺伝子断片と転写制御因子を混ぜ、ゲル電気泳動にかける。オートラジオグラフィーでDNAの位置を見ると、因子の結合したDNAはゆっくり動くので、通常バンドよりも遅れて移動するバンドとして検出される。

[7] 炎症性疾患の治療方法及び炎症性疾患の治療薬

本発明においては、以下の実施例5で示す通り、LT- α タンパク質の動脈壁隆起性病変部での発現状態を調べた結果、心筋梗塞患者由来の動脈壁隆起性病変部内血管平滑筋細胞およびマクロファージにおいてLT- α タンパク質が強く染色されており、病変の発生、進展に関連している可能性が示唆された。従って、LT- α タンパク質の発現や活性を抑制すれば病変の改善、再発又は予防が期待できる。

さらに、心筋梗塞感受性遺伝子産物であるLT- α の26Asn変異体は、野生型(26Thr)に比べて血管平滑筋細胞からの接着分子（VCAM-1, E-selectin）の誘導

能が強いことが知られている (Ozaki k. et al. Nature Genetics 32, 650-654, 2002)。本発明では、以下の実施例 6 で示す通り、ヒト冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC) および血球系細胞株 (HL-60) における LT- α 変異体 (26Asn) のサイトカイン誘導活性及び接着分子誘導活性について、26Thr の活性と比較した。その結果、図 5 及び 6 に示したように、LT- α (Asn26) は LT- α (Thr26) に比べて血管内皮細胞からの Tumor necrosis factor- α (TNF)、selectin-E mRNA を 2 倍高く、HL-60 細胞からは TNF, ICAM-1 (intracellular cell adhesion molecule-1) mRNA を 3 倍高く誘導した。これらの結果は、LT- α (26Asn) が心筋梗塞等の炎症性疾患の発症、進展に関与していることを示していると共に、LT- α の活性を抑制することによる心筋梗塞等の炎症性疾患の治療が期待できる。また、LT- α の活性を抑制するための手段としては、例えば、リンホトキシン- α (LT- α) に対する抗体を用いることができる。

また、リンホトキシン- α (LT- α) の発現又は活性を抑制する物質を有効成分として含む、炎症性疾患の治療薬も本発明の範囲内に含まれる。ここで用いるリンホトキシン- α (LT- α) の発現又は活性を抑制する物質としては、リンホトキシン- α に対する抗体が挙げられる。また、リンホトキシン- α に対する抗体としては、ヒト抗体又はヒト化抗体を使用することもできる。

リンホトキシン- α に対する抗体は、定法により作製することができる。例えば、リンホトキシン- α に対するポリクローナル抗体は、リンホトキシン- α を抗原として哺乳動物 (例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシ等) を当業者に公知の方法で免疫感作し、該哺乳動物から血液を採取し、採取した血液から抗体を分離・精製することにより得ることができる。抗原を投与する際には、適当なアジュバントを使用することもできる。血液からの抗体の分離・精製は、例えば遠心分離、硫酸アンモニウムまたはポリエチレングリコールを用いた沈澱、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等のクロマトグラフィー等の通常の方法によって行うことができる。

リンホトキシン- α に対するモノクローナル抗体は、ハイブリドーマを用いて作製することができる。リンホトキシン- α に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、抗体産生細胞（免疫動物から採取した脾細胞、リンパ節細胞、Bリンパ球等）とミエローマ細胞（例えば、マウスでは、P 3 X 6 3 A g 8、P 3 U 1 株、S p 2 / 0 株など）とをポリエチレングリコール又はセンダイウイルスなどの融合促進剤を用いて細胞融合させることにより作製することができる。細胞融合後のハイブリドーマの選抜にはヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン（H A T）培地を常法に従って使用することができる。得られたハイブリドーマから目的とするモノクローナル抗体を製造するには、通常の細胞培養法や腹水形成法により該ハイブリドーマを培養し、培養上清あるいは腹水から該モノクローナル抗体を精製すればよい。

〔8〕炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法

上記の通り、本発明では、炎症性疾患では、リンホトキシン- α の発現又は活性の亢進が関与していることが示されたことにより、リンホトキシン- α の発現又は活性を低下させる物質は、炎症性疾患の治療薬として有用であることが判明した。本発明によればさらに、リンホトキシン- α の発現又は活性を低下させる物質をスクリーニングする方法が提供される。上記スクリーニングの一例としては、細胞と候補物質とを接触させる工程、細胞内におけるリンホトキシン- α （L T- α ）をコードする遺伝子の発現量を分析する工程、及び候補物質の非存在下の条件と比較して当該遺伝子の発現量を低下させる候補物質を炎症性疾患の治療薬として選択する工程により行うことができる。また、上記スクリーニングの別の例としては、リンホトキシン- α （L T- α ）と候補物質とを接触させる工程、リンホトキシン- α の活性を測定する工程、及び候補物質の非存在下の条件と比較してリンホトキシン- α の活性を低下させる候補物質を炎症性疾患の治療薬として選択する工程により行うことができる。ここで言うリンホトキシン- α の活性とは、例えば、接着分子及び／又はサイトカインを誘導する活性であり、接着分子の具体例

としては、VCAM-1、ICAM-1又はE-セレクトインであり、サイトカインの具体例としてはTNFである。

候補物質としては任意の物質を使用することができる。候補物質の種類は特に限定されず、例えば、本明細書中上記〔5〕に記載した各種のライブラリー等を使用することができる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

実施例1（関連性研究）

（1）方法

①被験者

一般に、心筋梗塞の診断には、次に挙げる3つの基準のうち2つを必要とする：（1）胸の圧迫、痛み、又は締め付けが30分以上継続する臨床歴、（2）少なくとも一の標準又は二の胸部誘導において0.1mVより大きいST-セグメント上昇、（3）通常の実験値の2倍よりも大きい血清クレアチンキナーゼ濃度における上昇。これらの基準によって心筋梗塞と診断された患者1,133名を被験者とした。心筋梗塞患者の被験者の年齢範囲は28～85才で、平均年齢は62.5才であった。一方、幾つかの医療機関を通じて志願した健常者1,006名を対照とした。対照の被験者の年齢範囲は5才から88才で、平均年齢は38.5才であった。なお、すべての被験者は日本人であった。

②SNP発見及びゲノタイピング

全ゲノム関連性研究のために、ウェブサイト (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp>) 上で利用できるSNPデータベースを用いた。SNPsのスクリーニングは既報 (Iida, A., et al., J. Hum. Genet., 46, 668-683, 2001) に従って行った。LT- α 、TNF- α 、LST1、IC7、アログラフト炎症因子-1 (allograft inflammatory-factor-1 (AIF-1))、I kappa B-like protein (IKBL)、

V-ATPase G-subunit like protein(ATP6G)、BAT1、MICB及びp5-1を含む約130kbの6p21上の関連領域(図1、上パネル)をスクリーニングした。スクリーニングに先立って、GeneBankデータベースからの配列Y14768、AP000506及びAC004184をアセンブリングすることによって約130kbの参照配列を作成した。PCRプライマーデザイン、PCR実験、DNA抽出、DNA配列及びSNP発見のためのプロトコルはIida, A., et al., J. Hum. Genet., 46, 668-683, 2001に記載に従った。130kb領域におけるSNPsはインベーターアッセイ又はPCR産物のダイレクトシーケンスによってcapillary sequencer (ABI3700、Applied Biosystems)を用いて既報(Ohnishi, Y., et al., J. Hum. Genet., 46, 471-477, 2001; Iida, A., et al., J. Hum. Genet., 46, 668-683, 2001)に従って行った。

本実施例で使用したプライマー及びプローブを以下に記載する。

(1) LT- α (インベーター法によりタイピング)

PCR プライマー

フォワードプライマー: ACTCAGCCAAGGGTGCAGAG (配列番号9)

リバースプライマー: CTCCTCAGGGATTGAGACCTC (配列番号10)

プローブ (括弧内は SNP)

Exon 1 10G>A

TCCAAAGCACGAAGCACGGGCAGCCCAAGGAGATGGGGCAGGAGAGCCTCACCTGCTGTG[CT]GGAGCCCC
TGGGCCCCGACGCTCAGGTCCCTTTATAGAGGAAGCGGCAGTGGCAGCGTGG (配列番号11及び12)

Intron 1 90A>G

AGAGAAACCCCAAGGTGAGCAGAGGGAGACAGAGAGAGACAGGAAGGGAACAGAGAGGAA[TC]CATGGCAG
AAACAGAGAATGTGTGACAGAGACAATGAGACTGACAGATGGAGAGTCAGAG (配列番号13及び14)

Exon 3 81C>A

TCACACCTTCAGCTGCCCAGACTGCCCGTCAGCACCCCAAGATGCATCTTGCCCACAGCA[CA]CCTCAAAC

CTGCTGCTCACCTCATTGGTAAACATCCACCTGACCTCCCAGACATGTCCCC (配列番号 1 5 及び 1 6)

(2) I K B L (シーケンス法によりタイピング)

PCR プライマー

フォワードプライマー: TTTAAGGCTCAGGAGCCCAG (配列番号 1 7)

リバープライマー: TCCCTGTTGTTGTCCCACTG (配列番号 1 8)

シーケンスプライマー: ATATCATGTACCCGGCAGAC (配列番号 1 9)

(3) B A T 1 (インベーター法によりタイピング)

PCR プライマー

フォワードプライマー: TGGTCTCACATCACTGTTACGC (配列番号 2 0)

リバープライマー: TCTTCCCGCTCGGATTCAG (配列番号 2 1)

プローブ:

AAGCTTACCTAAACAGGGAGAGCGCGTATGGCGGCAGCAACAGCGACGAAGGAGGGAAAT[GC]TGCCTTCA
CTTCCGGTTGCAGGCTTCCCTCTACTCCAGCCTCCCGCCTTCTTGGCTGCAA (配列番号 2 2 及び 2 3)

③統計学的分析

関連性研究のための統計学的分析、ハプロタイプ頻度及び Hardy-Weinberg 平衡、及び LD 係数 (D') の計算は既報 (Yamada, R., et al., Am. J. Hum. Genet, 68, 674-485, 2001) に従って行った。

(2) 実験結果

関連性研究の第 1 のステップとして、ハイスループットマルチプレックス PCR-インベーターアッセイ法 (Ohnishi, Y., et al., J. Hum. Genet., 46, 471-477, 2001) を用いて 94 名の心筋梗塞患者をゲノタイピングし、その結果を健常人集団に見出されるアレル頻度と比較した。約 75,000 の遺伝子をベースとした SNPs のスクリーニングの結果、染色体 6 p 21 上の $LT-\alpha$ 遺伝子内にあるひとつの SNP (イントロン 1 ; 252 A>G) の心筋梗塞に対する弱い関連性を同定することができた ($\chi^2=9.4$, $p=0.0022$; マイナーアレルに対するホモ接合体対

その他)。続いて全部で 1,133 名の心筋梗塞患者と 1,006 の対照者をゲノタイピングした結果、 χ^2 値が 18.0 ($p=0.000022$; マイナーアレルに対するホモ接合体対その他) 及びオッズ比が 1.69 (95%コンフィデンスインターバル (CI); 1.32-2.15、表 1) となり、その関連性はずっと顕著になった。これらのデータは、心筋梗塞感受性遺伝子がこの領域内に存在することを示した。

LDマッピングのための高密度 SNP マップを 16 名の心筋梗塞患者と 16 名の対照者からの DNA のダイレクトシーケンシングによって構築した。TNF- α 、LT- β 、IkappaB-like protein (IKBL)、及び BAT1 (図 1、上パネル) に関連する分子をコードするいくつかの他の分子を含んでいる約 130 キロベースの 6 p 21 上の関連領域をスクリーニングした。該領域に全部で 187 個の SNPs を同定し、そして 94 名の心筋梗塞患者と一般的な集団からの 94 名の対照を 120 個のそれらのマーカーに対してゲノタイピングし、エレクトロフェログラム上でヌクレオチドシグナルのピークレベルを比較することによって大まかに推定された約 10% 以上のアレル頻度に基づいて選択した。最終的に、疾患関連性遺伝子と決定するに十分に高いアレル頻度を有する 26 SNPs が (>25%、マイナーアレル)、p5-1 及び AIF-1 の近くに D' drop off を伴う強い LD の広がりのある一つのブロックを示した (図 1、下パネル)。よって心筋梗塞感受性遺伝子がこれらの 2 つの遺伝子座の間に位置すると結論し、試料サイズを拡大することによってこれらの 26 個の SNPs をタイピングした。それらのほとんどは心筋梗塞表現型との顕著な関連性は示さなかったが、これらの 26 個の SNPs のうちの 4 個は心筋梗塞患者と対照との間でマイナーアレルに対するホモ接合性の頻度を比較したとき、心筋梗塞との強い関連性を表した (表 1)。これらの SNPs は LT- α のエキソン 1 内の 10 G>A 及びエキソン 3 内の 723 C>A (Thr26Asn)、IKBL のプロモーター領域内の -63 T>A、及び BAT1 のプロモーター領域内の -23 G>C であった。4 つの全てはほとんど完全に互いに連鎖しており、その領域内の特定のハプロタイプはそれぞれの SNP 単独よりも心筋梗塞との関連性に対してより高い統計学的有意差を示した。各 SNP に

対するゲノタイプの分布に関する Hardy-Weinberg 平衡は、患者群と対照群両方に対する χ^2 試験によって評価し、顕著な偏差を示さなかった ($p > 0.01$)。これらの SNP 遺伝子座はほとんど同じ程度の心筋梗塞との関連性を有しているので、LT- α 、IKBL 及び BAT1 のすべてが心筋梗塞感受性に影響を及ぼす候補と考えることができた。

表 1 :

LT- α 、IKBL、及びBAT1における心筋梗塞とSNP s の関連性

ゲノタイプ	心筋梗塞 (N=1,133)	対照 (N=1,006)	χ^2 [p value]	OR (95%CI)
LT- α exon1 10G>A				
GG	416(36.7%)	378(37.6%)		
GA	504(44.5%)	512(50.9%)	AA vs. GG+GA	1.78
AA	213(18.8%)	116(11.5%)	21.6 [0.000033]	(1.39-2.27)
LT- α intron1 252A>G				
AA	413(36.5%)	371(36.9%)		
AG	511(45.1%)	516(51.3%)	GG vs. AA+AG	1.69
GG	209(18.4%)	119(11.8%)	18.0 [0.000022]	(1.32-2.15)
LT- α exon3 723C>A,T26N				
CC	414(36.5%)	374(37.2%)		
CA	506(44.7%)	516(51.3%)	AA vs. CC+CA	1.78
AA	213(18.8%)	116(11.5%)	21.6 [0.000033]	(1.39-2.27)
IKBL promoter -63T>A				
TT	406(35.8%)	374(37.2%)		
TA	521(46.0%)	509(50.6%)	AA vs. TT+TA	1.6
AA	206(18.2%)	123(12.2%)	14.5 [0.000129]	(1.25-2.03)
BAT1 promoter -23G>C				
GG	411(36.3%)	374(37.2%)		
GC	517(45.6%)	510(50.7%)	CC vs. GG+GC	1.6
CC	205(18.1%)	122(12.1%)	14.7 [0.000129]	(1.26-2.04)

実施例 2 (LT- α のイントロン 1 内の SNP によってもたらされる転写活性の増加)

(1) 実験方法

LT- α の-307 から 268 まで、IKBL の-635 から 15 まで、及び BAT 1 の-1231 から 30 までに対応する DNA 断片を、ゲノム DNA を鋳型として用いて PCR によって増幅し、pGL3-basic vector (Promega) に 5' - 3' 方向にクローニングした。Jurkut 細胞 (RIKEN Cell Bank から入手 ; RCB0806) は 10% ウシ胎児血清を添加した PRMI1640 培地内で成長させた。LT- α 遺伝子における 2 つの SNPs、エキソン 1 内の 10G>A 及びイントロン 1 内の 252A>G がその発現レベルに影響を与えるかどうかを決定するために、両方の SNPs (それぞれ 10G-252A, 10A-252G 及び 10A-252A ハプロタイプ) を含むゲノム断片をルシフェラーゼ遺伝子転写ユニットの上流に含む 3 種のプラスミドを構築した。

上記 Jurkut 細胞 (2×10^6) に、10ug の上記プラスミド構築物と 2.5ug の pRL-TK ベクター (トランスフェクション効率のための内部制御) を LipoTAXI トランスフェクション試薬 (Stratagene) を用いてトランスフェクトした。6 時間後、細胞を PMA (20ng/ml) 及びイソノミシン (1uM) (Sigma) で刺激した。24 時間後、細胞を集め、ルシフェラーゼ活性を Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて測定した。

また、IKBL 及び BAT 1 遺伝子のプロモーター領域における SNPs の転写効率に与える影響を同様にして調べた。

(2) 実験結果

図 2 A に示すように、10A-252G ハプロタイプを含むクローンは他の 2 つのハプロタイプを含むクローンよりも 1.5 倍の転写活性を示し、エキソンにおける一つの置換ではなく、イントロン 1 における置換が LT- α 遺伝子の転写に影響を与えることを示した。すなわち、心筋梗塞に強い関連性を示す LT- α 遺伝子におけるこれら 2 つの SNPs はその発現レベルに影響を与えることがわか

った。

一方、同じく心筋梗塞と顕著な関連性を示す I K B L (- 6 3 T > A) のプロモーター領域における S N P は転写活性の適度な減少が認められた (図 2 B)。I K B L は I k B ファミリーのメンバーで、N F kappa B (N F - κ B) / r e l p o t e i n のような転写因子に対する阻害分子である (Albertella, M. R., et al., Hum. Mol. Genet., 3, 793-799, 1994)。L T - α プロモーター領域における D N A 配列は N F - κ B, S P - 1 及び A P - 1 / c - f o s / j u n を含む数種の核因子に対する結合モチーフを含むという事実から判断すると (Messer, G. et al., J. Exp. Med., 173, 209-219, 1991)、I K B L はこれらの核因子の阻害を通じて L T - α の転写を制御すると考えられる。

実施例 3 (L T - α のイントロン 1 に対する未知の核因子の結合)

(1) 実験方法

Jurkat 細胞からの核抽出物が 2 5 2 A 又は 2 5 2 G アレルを含むゲノム配列に対応するオリゴヌクレオチドに結合できるかどうかを調べた。Andrews, N. C. et al., Nucleic Acid Res., 11, 2499, 1991 に記載したように、Jurkat 細胞から調製した核抽出物をジオキシゲニン (DIG) - 11 - ddUTP にて標識した 33bp のオリゴヌクレオチドと DIG - gel shift kit (Roche) を用いてインキュベートした。競合研究のために、未標識のオリゴヌクレオチド (100 倍過剰) を DIG - 標識オリゴヌクレオチドの添加前に核抽出物と前培養した。タンパク質 / D N A 複合体を 0.5 × Tris / ホウ酸 / EDTA (TBE) 緩衝液中、未変性 7 % ポリアクリルアミドゲル上で分離した。ゲルをニトロセルロース膜に移し、シグナルの検出を化学発光検出システム (Roche) を用いて製造者の指示に従って行った。

(2) 実験結果

図 3 に示すように、G アレルに対応するオリゴヌクレオチドを用いたとき現れるバンドは A アレルに対応するバンドよりも強く、これは Jurkat 細胞に存在する幾つかの核因子が A アレルに対するよりも G アレルに対してより強固に結合した

ことを示す。実験は3回行い同様な結果を得た。この結果はこの領域に結合することによってLT- α の転写を制御する一つ又はそれ以上の核抽出物における未同定の分子が心筋梗塞に関連しているかもしれないことを示す。

実施例4 (LT- α タンパク質内のT26N変異による接着分子の誘導)

(1) 実験方法

LT- α 産物は、その炎症プロセスへの寄与のように、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、及び種々の白血球から接着分子及びサイトカインを誘導することができる ((Ross, R., N. Engl. J. Med., 340, 115-126, 1999; Ware, C.F., et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 198, 175-218, 1995)。これらの生物学的活性が遺伝子産物におけるアミノ酸置換によって影響されるかどうかを調べた。コドン26におけるSNPはスレオニンからアスパラギンへのアミノ酸変化をもたらす。従って、各アレル(26N-LT- α は26T-LT- α)について接着分子及びサイトカインの発現を誘導する能力を培養したヒト冠状動脈血管内皮細胞(HCAEC)及びヒト冠状動脈平滑筋細胞(HCASMC)を用いて次のようにして調べた。

まず、精製した大腸菌由来組み換え体26N-LT- α 及び26T-LT- α をpET43 system (Novagen)を用いて調製した。HCAEC及びHCASMC (BioWhittaker, Inc.)を5ng/mlのLT- α タンパク質(26N-LT- α 又は26T-LT- α)で4時間処理した。全RNAをトリゾール (Life Technologies)を用いて単離した。cDNAを2 μ gの全RNAからdT15プライミングによって調製し、SuperScript 逆転写酵素 (Life Technologies)を用いて合成した。mRNAをQuantiTect SYBR Green PCR kit(QIAGEN)及びABI Prism 7700 sequence detector (Applied Biosystems)を用いて定量した。各試験は3回繰り返えし、各試料は三重に試験した。

(2) 実験結果

変異タンパクである26N-LT- α は26T-LT- α よりもHCASMC

において血管細胞接着分子-1 (VCAM-1) 及びE-セレクトインmRNAについて2倍高い転写活性レベルを示した(図4)。

実施例5 (LT- α タンパク質の動脈壁隆起性病変部での発現状態)

(1) 実験方法

動脈壁隆起性病変部位のパラフィン包埋切片をシランコーティングスライド上に貼り付け、キシレンを用いて脱パラフィン操作を行った。その後、マイクロウェーブにより抗原性を賦活し、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害するために3%過酸化水素水/エタノールで15分処理し、非特異的反応を抑えるために5%スキムミルク液でブロッキング反応を行った。5 μ g/mlの抗LT- α 抗体(R & D社)を用いて、40°C、一晩反応し、洗浄後、2次抗体(rabbit ENVISION Polymer Reagent; DAKO社)を加え、室温で1時間反応した。ペルオキシダーゼ基質を用いて発色後、顕微鏡下でLT- α タンパク質のシグナルを観察した。ネガティブコントロールとして、非免疫正常ヒツジIgG(DAKO社)を用いて同様に染色した。

(2) 実験結果

上記の免疫染色の結果、心筋梗塞患者由来、動脈壁隆起性病変部内血管平滑筋細胞およびマクロファージにおいてLT- α タンパク質が強く染色されることが確認された。この結果より、LT- α タンパク質が病変の発生、進展に関連している可能性が示唆された。

実施例6 (LT- α 変異体(Asn26)による血管内皮細胞、血球系細胞株からのサイトカイン、接着分子の誘導)

(1) 実験方法

冠動脈血管内皮細胞(Bio Whittaker社)は血管内皮細胞専用培地(Bio Whittaker社)、HL-60(RIKEN cell BANK)はRPMI-1640培地(SIGMA社)で培養した。LT- α タンパク質の作製、サイトカイン、接着分子mRNAの誘導の評価は既報(Ozaki k. et al. Nature Genetics 32, 650-654, 2002)に従って行っ

た。

(2) 実験結果

ヒト冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC) および血球系細胞株 (HL-60) での LT- α (26Asn) のサイトカイン、接着分子誘導活性について、LT- α (26Thr) の場合と比較した。結果を図 5 及び図 6 に示す。図 5 及び図 6 に示した通り、LT- α (Asn26) は LT- α (Thr26) に比べて血管内皮細胞からの Tumor necrosis factor- α (TNF)、selectin-E mRNA を 2 倍高く、HL-60 細胞からは TNF、ICAM-1 (intracellular cell adhesion molecule-1) mRNA を 3 倍高く誘導した。これらの結果から、LT- α (26Asn) が心筋梗塞等の炎症性疾患の発症、進展に関与していることを示された。

産業上の利用の可能性

本発明の方法によれば、心筋梗塞を初めとする炎症性疾患の発症の有無の判断、疾患発症の可能性の判断を正確にかつ迅速に行うことができる。

請求の範囲

1. リンホトキシン- α (LT- α) 遺伝子、I Kappa B-like (IKBL) 遺伝子、及びBAT1 遺伝子より成る群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子に存在する少なくとも一種の遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。

2. リンホトキシン- α (LT- α) 遺伝子、I Kappa B-like (IKBL) 遺伝子、及びBAT1 遺伝子より成る群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子に存在する少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。

3. 下記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。

(1) 配列番号1に示すLT- α 遺伝子のエキソン1の塩基配列の10番目の塩基におけるG/Aの多型

(2) 配列番号2に示すLT- α 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基におけるA/Gの多型

(3) 配列番号3に示すLT- α 遺伝子のエキソン3の塩基配列の81番目の塩基におけるC/Aの多型

(4) 配列番号4に示すIKBL 遺伝子のプロモーターの塩基配列の572番目の塩基におけるT/Aの多型

(5) 配列番号5に示すBAT1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の1228番目の塩基におけるG/Cの多型

4. 配列番号1に示すLT- α 遺伝子のエキソン1の塩基配列の10番目の塩基と配列番号2に示すLT- α 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基の組み合わせが、G-Aヘテロ接合体であるか、A-Gヘテロ接合体であるか、A-Aホモ接合体であるかを検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。

5. 配列番号3に示すLT- α 遺伝子のエキソン3の塩基配列の80番目から

8 2 番目の塩基の少なくとも一つが他の塩基に置換されることによって、コードされるアミノ酸がスレオニンからアスパラギンに変異する遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。

6. 炎症性疾患が心筋梗塞である、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

7. 配列番号 1 から 5 に示される配列における、下記の (1) から (5) よりなる群から選ばれる少なくとも 1 つの部位を含む連続する少なくとも 10 塩基の配列、又はその相補配列にハイブリダイズすることができ、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法においてプローブとして用いるオリゴヌクレオチド。

(1) 配列番号 1 に示す LT- α 遺伝子のエクソン 1 の塩基配列の 10 番目の部位

(2) 配列番号 2 に示す LT- α 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目部位

(3) 配列番号 3 に示す LT- α 遺伝子のエクソン 3 の塩基配列の 81 番目の部位

(4) 配列番号 4 に示す I K B L 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 572 番目の部位

(5) 配列番号 5 に示す B A T 1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1228 番目の部位

8. 配列番号 1 から 5 に示される配列における、下記の (1) から (5) よりなる群から選ばれる少なくとも 1 つの部位を含む連続する少なくとも 10 塩基の配列、及び／又はその相補配列を増幅することができ、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法においてプライマーとして用いるオリゴヌクレオチド。

(1) 配列番号 1 に示す LT- α 遺伝子のエクソン 1 の塩基配列の 10 番目の部位

(2) 配列番号 2 に示す LT- α 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目部位

(3) 配列番号 3 に示す LT- α 遺伝子のエクソン 3 の塩基配列の 81 番目の部

位

(4) 配列番号4に示すIKBL遺伝子のプロモーターの塩基配列の572番目の部位

(5) 配列番号5に示すBAT1遺伝子のプロモーターの塩基配列の1228番目の部位

9. プライマーがフォワードプライマー及び/又はリバースプライマーである請求項8に記載のオリゴヌクレオチド。

10. 請求項7から9のいずれかに記載のオリゴヌクレチドの1種以上を含む、炎症性疾患診断用キット。

11. 炎症性疾患が心筋梗塞である請求項10に記載のキット。

12. 下記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の塩基多型を検出することを含む、LT- α 、IKBL、又はBAT1の発現状態の分析方法。

(1) 配列番号1に示すLT- α 遺伝子のエキソン1の塩基配列の10番目の塩基におけるG/Aの多型

(2) 配列番号2に示すLT- α 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基におけるA/Gの多型

(3) 配列番号3に示すLT- α 遺伝子のエキソン3の塩基配列の81番目の塩基におけるC/Aの多型

(4) 配列番号4に示すIKBL遺伝子のプロモーターの塩基配列の572番目の塩基におけるT/Aの多型

(5) 配列番号5に示すBAT1遺伝子のプロモーターの塩基配列の1228番目の塩基におけるG/Cの多型

13. 下記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の塩基多型を含むLT- α 、IKBL、又はBAT1遺伝子断片を細胞に導入し、該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することを含む、LT- α 、IKBL、又はBAT1の転写活性の測定方法。

(1) 配列番号 1 に示す LT- α 遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の塩基における G/A の多型

(2) 配列番号 2 に示す LT- α 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の塩基における A/G の多型

(3) 配列番号 3 に示す LT- α 遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 81 番目の塩基における C/A の多型

(4) 配列番号 4 に示す I K B L 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 572 番目の塩基における T/A の多型

(5) 配列番号 5 に示す B A T 1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1228 番目の塩基における G/C の多型

14. 下記の (1) から (5) よりなる群から選ばれる少なくとも一種の塩基多型を含む LT- α 、I K B L、又は B A T 1 遺伝子断片を細胞に導入し、LT- α 、I K B L、又は B A T 1 の転写活性を阻害する候補物質の存在下で該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することを含む、LT- α 、I K B L、又は B A T 1 の転写活性阻害物質のスクリーニング方法。

(1) 配列番号 1 に示す LT- α 遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の塩基における G/A の多型

(2) 配列番号 2 に示す LT- α 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の塩基における A/G の多型

(3) 配列番号 3 に示す LT- α 遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 81 番目の塩基における C/A の多型

(4) 配列番号 4 に示す I K B L 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 572 番目の塩基における T/A の多型

(5) 配列番号 5 に示す B A T 1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1228 番目の塩基における G/C の多型

15. 請求項 14 に記載のスクリーニング方法により得られる LT- α 、I K B L、又は B A T 1 の転写活性阻害物質。

16. 前記LT- α 、IKBL、又はBAT1遺伝子断片の下流にリポーター遺伝子を結合させた転写ユニットを細胞に導入し、該細胞を培養し、リポーター活性を測定することによって該遺伝子の発現を分析する、請求項13又は14に記載の方法。

17. 前記リポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である請求項16に記載の方法。

18. 下記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含む遺伝子断片とLT- α 、IKBL、又はBAT1の転写制御因子の存在が予想される試料を接触させ、上記断片と転写制御因子との結合を検出することを含む、LT- α 、IKBL、又はBAT1の転写制御因子のスクリーニング方法。

(1) 配列番号1に示すLT- α 遺伝子のエクソン1の塩基配列の10番目の塩基におけるG/Aの多型

(2) 配列番号2に示すLT- α 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基におけるA/Gの多型

(3) 配列番号3に示すLT- α 遺伝子のエクソン3の塩基配列の81番目の塩基におけるC/Aの多型

(4) 配列番号4に示すIKBL遺伝子のプロモーターの塩基配列の572番目の塩基におけるT/Aの多型

(5) 配列番号5に示すBAT1遺伝子のプロモーターの塩基配列の1228番目の塩基におけるG/Cの多型

19. 検出がゲルシフトアッセイにより行われる請求項18に記載の方法。

20. 配列番号2に示すLT- α 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基におけるC/Aの多型を含む遺伝子断片を接着分子誘導性細胞に導入し、該細胞の接着分子の誘導化能を評価する方法。

21. 前記細胞がヒト冠状動脈平滑筋細胞(HCASMC)である請求項20に記載の方法。

22. 前記接着分子が血管細胞接着分子-1 (VCAM-1) 又はE-セレクチンである請求項20に記載の方法。

23. リンホトキシン- α (LT- α) の発現又は活性を抑制することを含む、炎症性疾患の治療方法。

24. 炎症性疾患が心筋梗塞である、請求項23に記載の方法。

25. リンホトキシン- α (LT- α) に対する抗体を用いる、請求項23又は24に記載の方法。

26. リンホトキシン- α (LT- α) の発現又は活性を抑制する物質を有効成分として含む、炎症性疾患の治療薬。

27. リンホトキシン- α (LT- α) の発現又は活性を抑制する物質が、リンホトキシン- α に対する抗体である、請求項26に記載の治療薬。

28. 細胞と候補物質とを接触させる工程、細胞内におけるリンホトキシン- α (LT- α) をコードする遺伝子の発現量を分析する工程、及び候補物質の非存在下の条件と比較して当該遺伝子の発現量を低下させる候補物質を炎症性疾患の治療薬として選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法。

29. リンホトキシン- α (LT- α) と候補物質とを接触させる工程、リンホトキシン- α の活性を測定する工程、及び候補物質の非存在下の条件と比較してリンホトキシン- α の活性を低下させる候補物質を炎症性疾患の治療薬として選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法。

30. リンホトキシン- α の活性が、接着分子及び／又はサイトカインを誘導する活性である、請求項29に記載の方法。

31. 接着分子が、VCAM-1、ICAM-1 又はE-セレクチンであり、サイトカインがTNFである、請求項30に記載の方法。

32. リンホトキシン- α (LT- α) の発現量又は活性の低下が、IKBL遺伝子の発現量又は活性の増加を介したものである、請求項28又は29に記載の方法。

要約書

本発明の目的は、心筋梗塞と関連性のある一塩基多型 (SNPs) を同定し、これらの SNPs を利用して心筋梗塞をはじめとする炎症性疾患を判定するである。本発明によれば、リンホトキシン- α (LT- α) 遺伝子、I Kappa B-like (IKBL) 遺伝子、及びBAT1 遺伝子より成る群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子に存在する少なくとも一種の遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法、該方法に使用されるオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドを含む炎症性疾患診断用キット、並びにそれらの利用が提供される。さらに本発明によれば、LT- α を利用した、炎症性疾患の治療方法及び炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法が提供される。

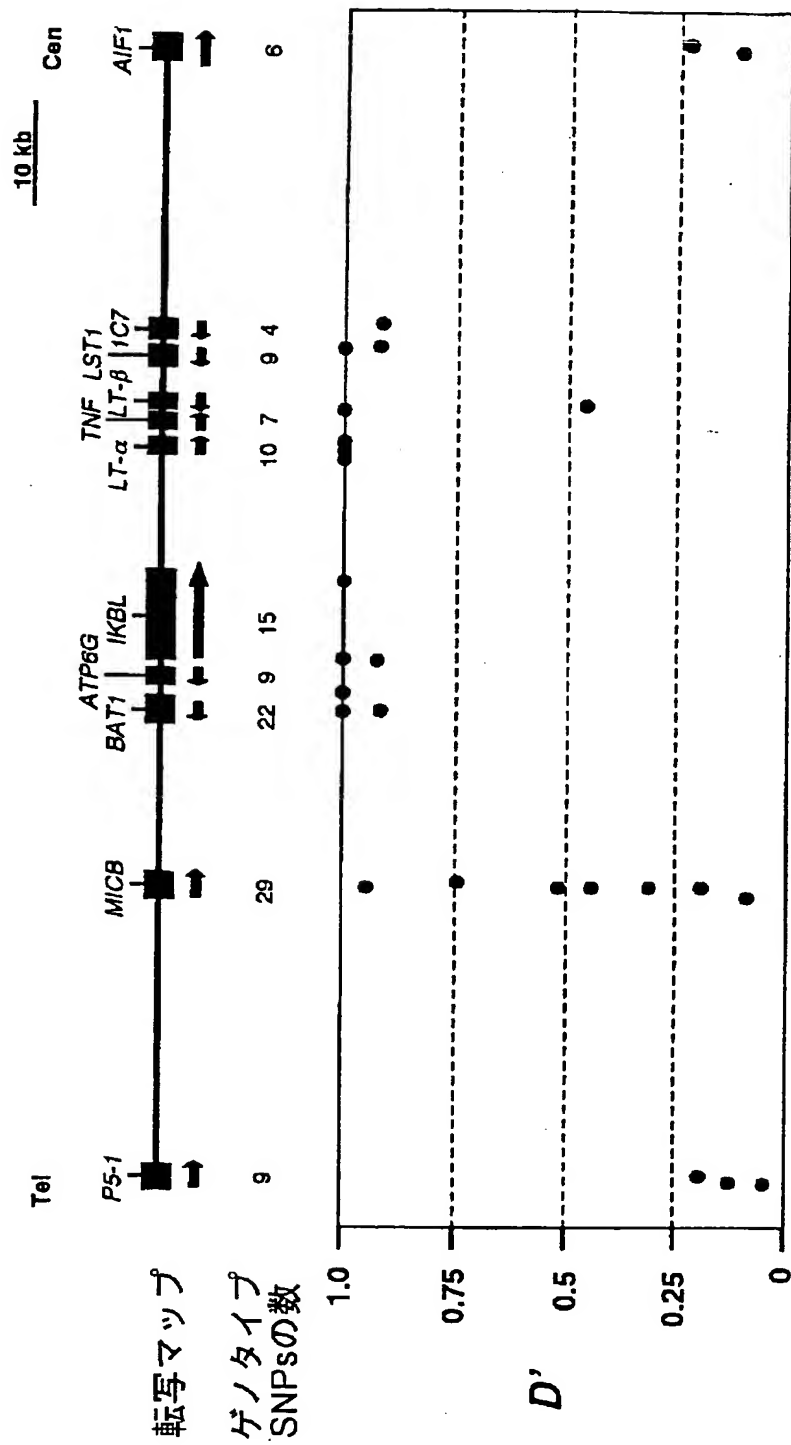
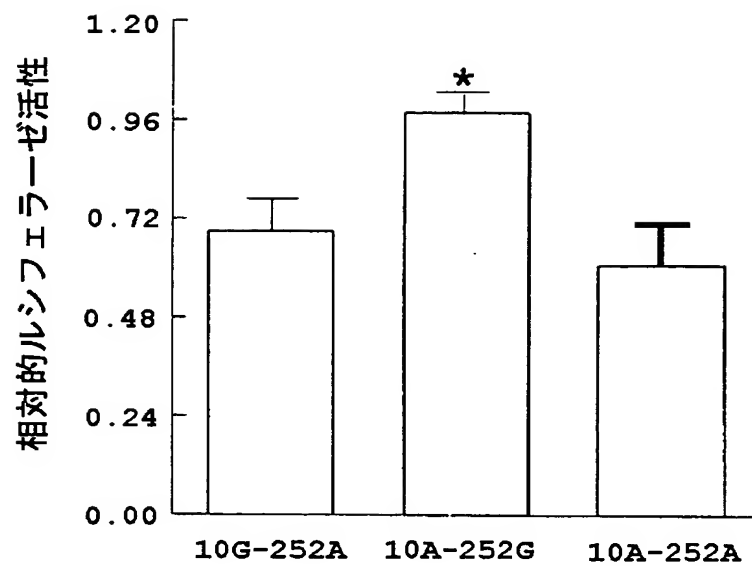
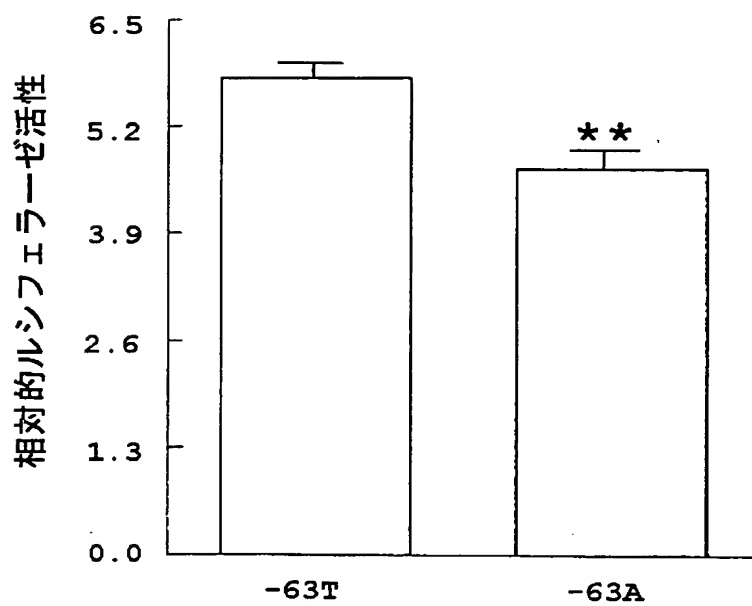


図 2

A



B



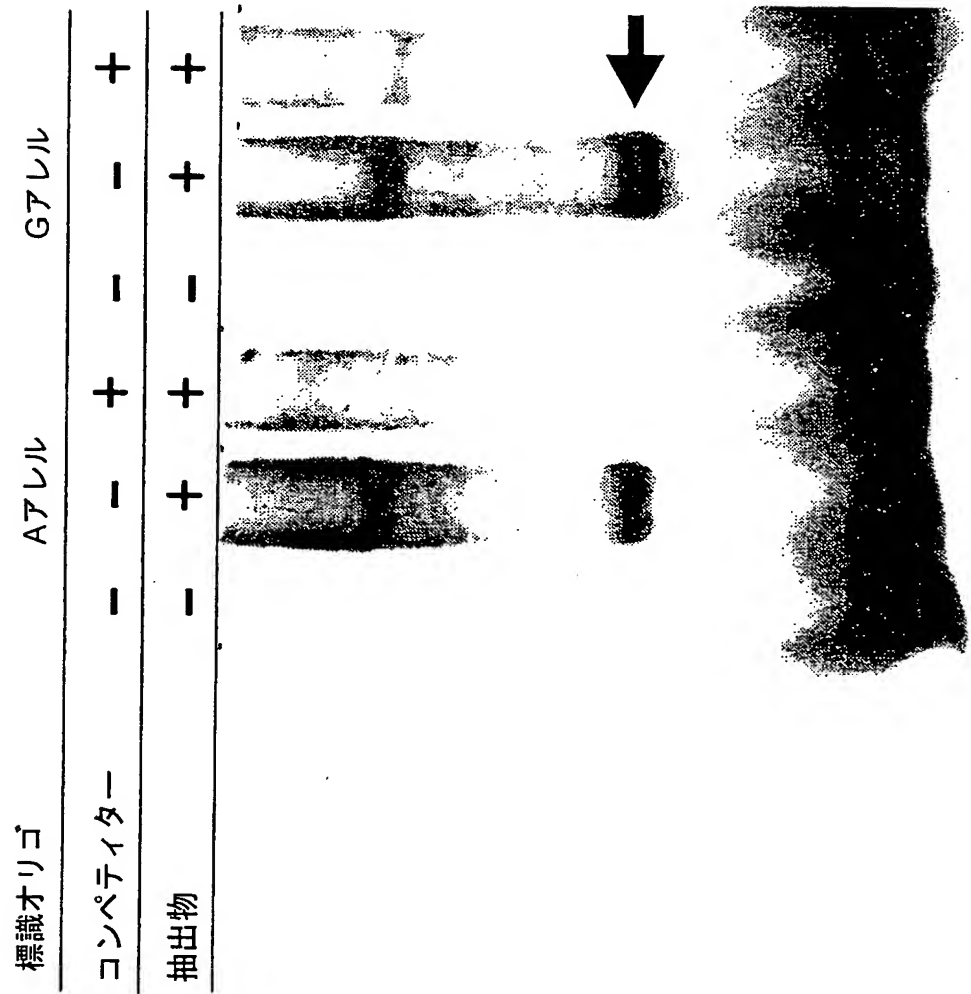
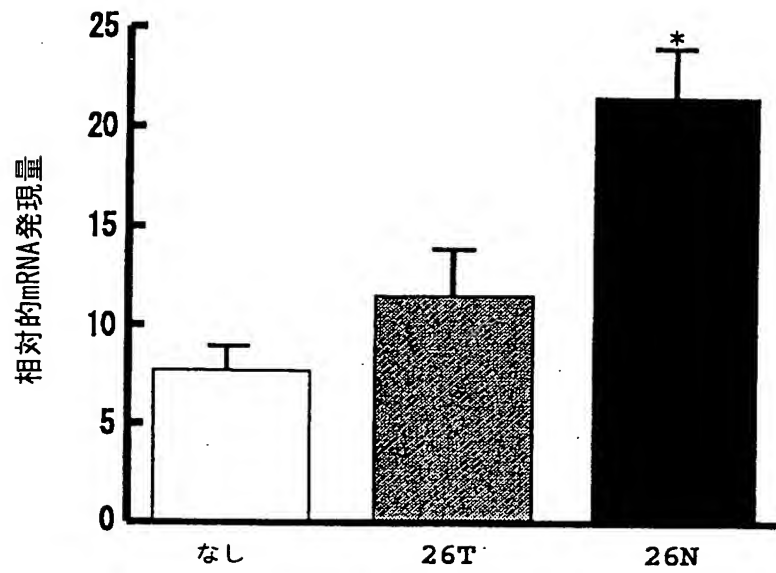


図 4

A



B

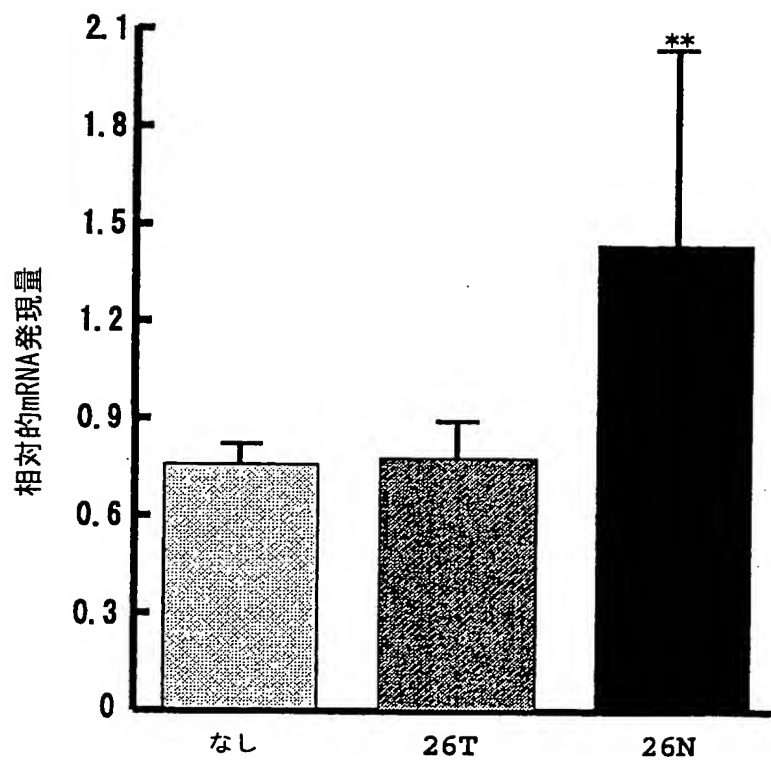
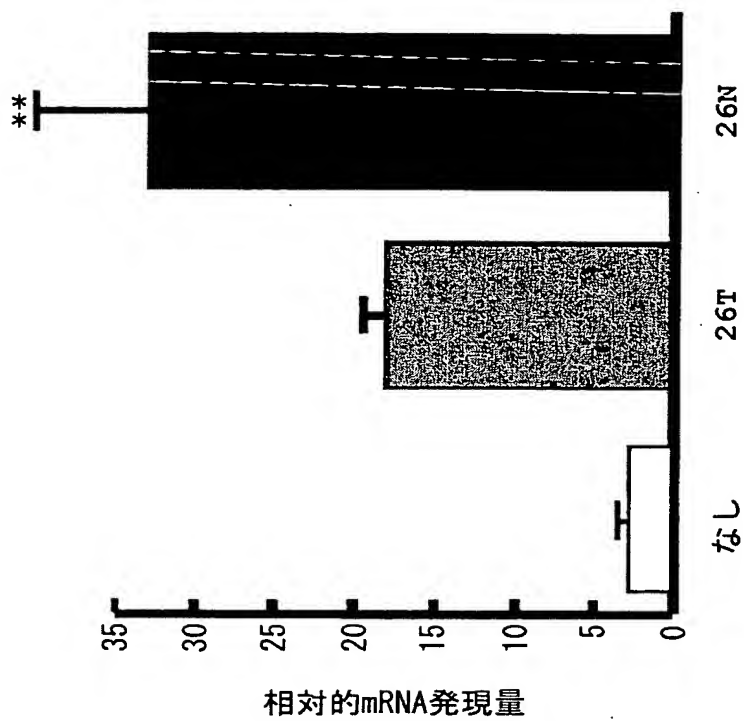


図 5

Selectin E



TNF

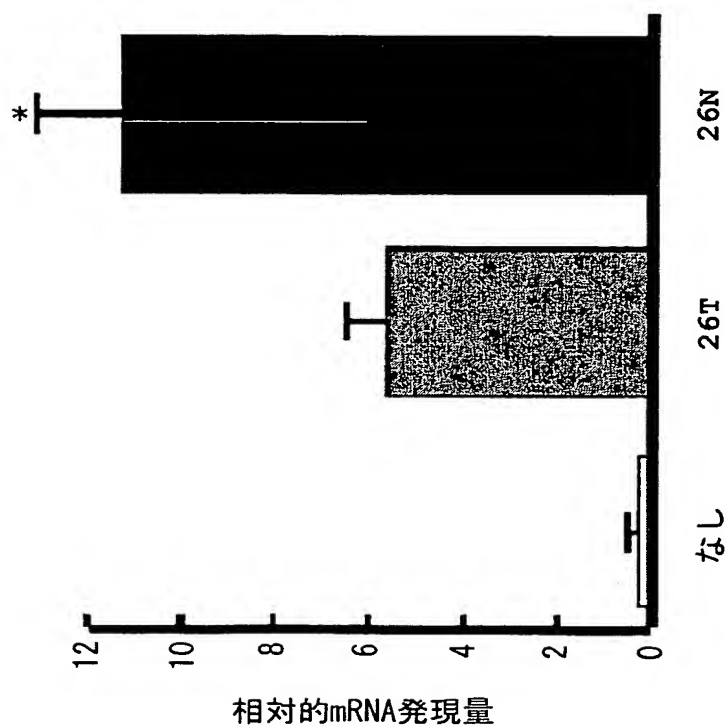
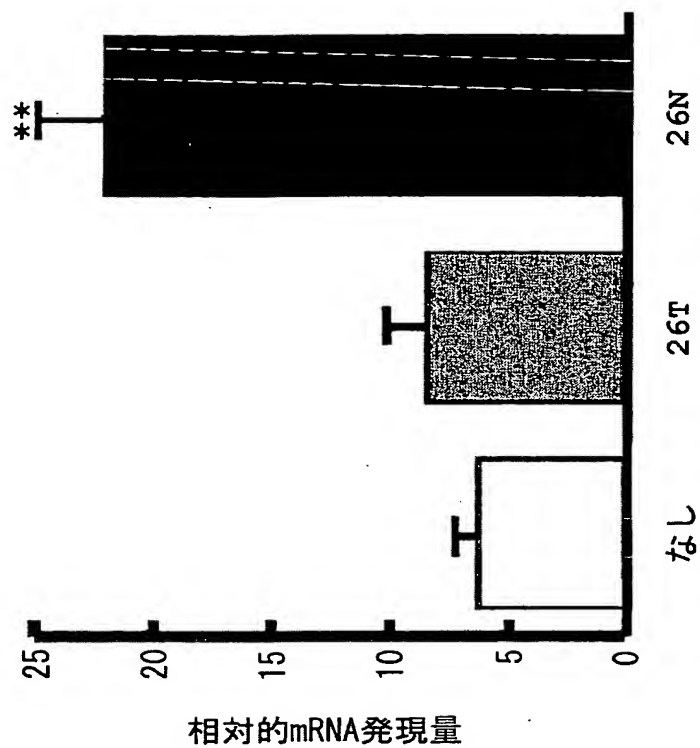
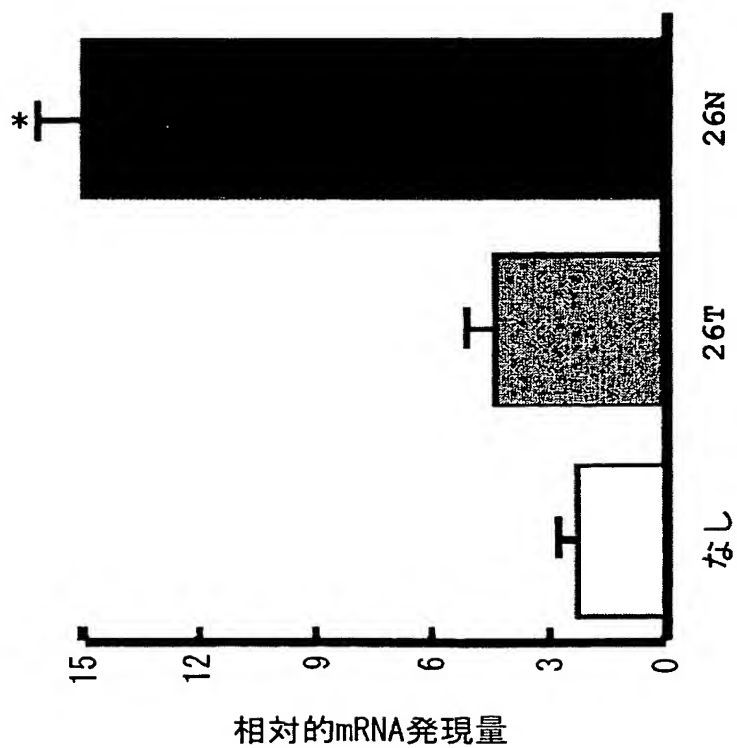


図 6

ICAM1



TNF



SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN et al.

<120> Method for judging inflammatory diseases

<130> A31454A

<160> 23

<210> 1

<211> 162

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

aggggctccg cacagcaggt gaggtctctc tgcccatct ccttgggctg cccgtgcttc 60
gtgcttttga ctaccgcca gcagtgtctt gccctctgcc tgggcctcgg tccctctctc 120
acctgtgcc tggatccccg gcctgcctgg gcctgggcct tg                               162

```

<210> 2

<211> 287

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

gtgggttttg ttttggtttc cttctctgtc tctgactctc catctgtcag tctcattgtc 60
tctgtcacac attctctgtt tctgcatga ttctctctctg ttcccttctt gtctctctct 120
gtctccctct gctcaccttg gggtttctct gactgcatct tgtcccttc tctgtcgatc 180
tctctctcgg gggtcggggg gtgctctctc ccagggcggg aggtctgtct tccgccgcgt 240
gccccgcccc gctcactgtc tctctctctc tctctctttc tctgcag                    287

```

<210> 3

<211> 107

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

```
ggggctccct ggtgttgcc tcacaccttc agctgccag actgccgctc agcaccctaa 60
gatgcattct gccacagca cctcaaacc tgcgtctcac ctctattg 107
```

<210> 4

<211> 634

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

```
caacctgtgt tgggaaaaga gcattctggg cttaattcta aactaactct ctacctttct 60
ctctctctcc accatcccgc cccctcccct gcctccggtt gtaacatct ccatcttttt 120
ctacatattt ctcaagtcca aatttttgca tctcacttgc cccatcctac gatagtcttc 180
ttccgtcttt tgtctgtatt tttctttttt ttgatctgt ccctgttggt gtcccactgt 240
ggtttttggt ttgttttcc atgtttaatg tgatttttat cctgtcttta tctcctctat 300
tttctctgtc ttctcatctt ttctgtccatc actgaaccat ctctctctc tgccaagtta 360
gaggaggcgg gaaaaaacct ccaaataact ctcttttctc cctccctcc cctgcctcc 420
ttttctctgc ctccagtcca gtcttctggt ttccagacggc ccctttaatt taagttccct 480
agtttccctt gggagatctg gccagaact acccggtcgg ggcggaacga catccggtta 540
cgccctctac agttcacttc cgtctctcac ctgctctctt gcttgcgcca ttctctccag 600
cctggagtgt ctccgccctt cccgcctccc gtct 634
```

<210> 5

<211> 1250

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

```
tgagatatgt tgctttgctt cgcttctgtc aataagatga gaataacggt acctactcct 60
tagtattaaa tgattaagta tgtaacagg gagaggcca aacgtttgtt gttttattac 120
acagcaggac atcaggctctt actttttag ctccccatct caaagacggg gatagcaaatt 180
gtttcattca ggaaaaaaat ccagggtgaa caatggggct gttggggcgg ggccaagaac 240
attctgctcg aattaacagt attaatgggc cgggcgcggt ggctcacgcc tgtaatccca 300
gcactctggg aggccgaagt gggtagatca cctgagggtc tacatgggtg aagccccgtc 360
tctactaaaa aaacaaaaat ttgctgggcg tggtagggcg cgctgtaat cctagctact 420
cgggaggctg aggcaggaga atcgcttgaa cccgggaagc agcggttgca gtgagccgag 480
atcaggacat tgcaactccc cctgggcgac agggcgagac tctgtctcaa aacaaaaaca 540
aaaacagtat taatggaatg tagtataacc ctcaagccct actattaaca ctgggggcgg 600
aatccagacc ccgtcttccc gctcggttc agaacacctt cctgactcac tggccctagg 660
gcatcagcta cctcgacag catccttttg ggaaaatacc gccaccagc cccagactg 720
ggaaagagtc gggaaacacc cccgagcaat ccagttccct gagacttccc tctcctcc 780
cctcagctag ggcccgccg ttcttagtgc gtgcccagca gtcctcaggt caccttact 840
accgggcca ggaccccggt ggaactcgca gccttcgcca cactcgttcc tcgcgcatcc 900
atggaggggt gcctacagag aagacctgcg tggcaaaaac ctaaacgaag agatgagggg 960
catggagagg agtaggataa gagaataaag ataacagtgg gggggagacg ttagtttctt 1020
ttatatcttt tgttactggc ggtagcagtg aagttagaaa cggttttaaa acaaatttca 1080
gacaggcatt ttccaaaggc aagcctggag cgcacggatc tgtataaccg cggaaggccc 1140
tgtttccggt cccttgcgcc tgcgctcttg cagccaagaa ggcgggaggc tggagtagag 1200
ggaagcctgc aaccggaagt gaaggcagat ttccctcctt cgtcgtgtt 1250
```

<210> 6

<211> 1386

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

gccccatctc cttgggctgc ccgtgcttcg tgctttggac taccgcccag cagtgtcctg 60
ccctctgcct gggcctcggt ccctcctgca cctgctgcct ggatccccgg cctgcctggg 120
cctgggcctt ggttctcccc atgacaccac ctgaacgtct cttcctccca aggggtgtgtg 180
gcaccaccct acacctcctc cttctggggc tgctgctggt tctgctgcct ggggcccagg 240
ggctccctgg tgttggcctc acaccttcag ctgcccagac tgcccgtcag caccccaaga 300
tgcatcttgc ccacagcacc ctcaaactg ctgctcacct cattggagac cccagcaagc 360
agaactcact gctctggaga gcaaacacgg accgtgcctt cctccaggat ggtttctcct 420
tgagcaacaa ttctctcctg gtccccacca gtggcatcta cttcgtctac tcccagggtg 480
tcttctctgg gaaagcctac tctcccaagg ccacctcctc cccactctac ctggcccatg 540
aggtccagct cttctcctcc cagtaccctt tccatgtgcc tctcctcagc tcccagaaga 600
tggtgtatcc agggctgcag gaaccttggc tgcactgat gtaccacggg gctgcgttcc 660
agctcaccca gggagaccag ctatccaccc acacagatgg catccccac ctagtctctca 720
gccctagtac tgtcttcttt ggagccttcg ctctgtagaa cttggaaaaa tccagaaaga 780
aaaaataatt gatttcaaga ctttctcccc attctgcctc cattctgacc atttcagggg 840
tcgtcaccac ctctcctttg gccattccaa cagctcaagt cttccctgat caagtcaccg 900
gagctttcaa agaaggaatt ctaggcatcc caggggacca cacctccctg aaccatccct 960
gatgtctgtc tggtgagga tttcaagcct gcctaggaat tcccagccca aagctgttgg 1020
tctgtccac cagctaggtg gggcctagat ccacacacag aggaagagca ggcacatgga 1080
ggagcttggg ggatgactag aggcagggag gggactatct atgaaggcaa aaaaattaaa 1140
ttattttatt atggaggatg gagagagggg aataatagaa gaacatccaa ggagaaacag 1200
agacaggccc aagagatgaa gagtgagagg gcatgcgcac aaggctgacc aagagagaaa 1260
gaagtaggca tgagggatca cagggcccca gaaggcaggg aaaggctctg aaagccagct 1320
gccgaccaga gccccacacg gaggcctctg caccctcgat gaagcccaat aaacctcttt 1380
tctctg 1386

<210> 7

<211> 1459

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ccgagcttct taaacacagg ccttgggcta cggctctggg ggtacttggg ggggcggggg 60
caggtctgat gagtaacccc tccccccagg ttccagagga agaagcctcc acatctgtct 120
gccggcccaa gagttccatg gcctccactt cccgccgcca acgccgagaa cgtcgttttc 180
gtcgttactt gtctgcagga cggctggtcc gggcccaggc cctcctccag cgacacccag 240
gcctcgatgt agatgctggg cagccccac cactgcaccg ggctgtgcc cgccacgatg 300
cccctgccct gtgcctgctg ctteggtcg gggctgacct tgcccaccag gaccgccatg 360
gggacacggc actgcatgct gctgcccgc agggcccaga tgcctacacc gatttcttcc 420
tcccgtgct aagccgctgt ccctctgcca tgggaataaa gaataaggat ggggagaccc 480
ctggccaaat tttgggctgg ggacccccct gggattctgc tgaagaggag gaagaagatg 540
atgcctcaa ggagcgggaa tggagacaga agctccaggg tgagctggag gacgagtggc 600
aggaagtcat ggggaggttt gaaggtgatg cctcccatga aaccaggaa cctgagtcct 660
tctcagcctg gtcagatcgc ctggcccggg aacatgccca gaagtgccag cagcagcagc 720
gagaagcaga gggatcctgt cgacccccac gtgctgaggg ctccagccag agctggcgac 780
acgaggagga ggagcagcgg ctcttcaggg agcgagcccg ggccaaggag gaagagctgc 840
gtgagagccg agccaggagg gcgcaggagg ctctagggga ccgagaacc aagccaacca 900
gggccggggc cagggaagag caccacagag gagcggggag gggcagcctc tggcgatttg 960
gtgatgtgcc ctggccctgc cctgggggag gggaccaga ggccatggct gcagccctgg 1020
tggccagggg ccccccttg gaggaacagg gggctctgag gaggtacttg aggggtccagc 1080
aggtccgctg gcaccctgac cgcttctgc agcgattccg aagccagatt gagacctggg 1140
agctgggccc tgtgatggga gcagtgcag ccctttctca ggccctgaat cgccatgcag 1200
aggccctcaa gtgaccctag ggaagaagca agaaacttcg gggctgcagc ctcaggatga 1260
ggcagaagga agggtaaggg aaaggatggg gaccacaagg aagagccagg tgctgctcag 1320

cagaggatat ggggtgggagc gaaagttgta acaagtgggg gtgggggggtg cgggcccga 1380
ccactgctcc ttgactctgc cgtttcctaa taagacctgg ttccacatct caaaaaaaaa 1440
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1459

<210> 8

<211> 1854

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

acaggcattt tccaaaggca agcctggagc gcacggatct gtataaccgc ggaaggccct 60
gtttccggtc ccttgcgcct gcgctcttgc agccaagaag gcgggaggct ggagtagagg 120
gaagcctgca accggaagtg aaggcagatt tccctccttc gtcgctgttg ctgccgccat 180
acgcgctctc cctgttttagc tcttctgtta gaaatagtat ctttgtttct ctttgctgtt 240
cctcaatccc ctactcttca ccccttgttt tcacctattt tgcgagaacc catccagatc 300
ccccttcctt tcttcccctg ccggcccagt tatggcagag aacgatgtgg acaatgagct 360
cttgactat gaagatgatg aggtggagac agcagctggg ggagatgggg ctgaggcccc 420
tgccaagaag gatgtcaagg gtcctatgt ctccatccac agctctgget ttcgtgactt 480
cctgctcaag ccagagttgc tccgggccat tgcgactgt ggctttgagc atccgtcaga 540
agtcagcat gaggcatcc ctccaggccat tctgggaatg gatgtcctgt gccaggccaa 600
gtcgggcatg ggaaagacag cagtgtttgt cttggccaca ctgcaacagc tggagccagt 660
tactgggcag gtgtctgtgc tggatgatgt tcacactcgg gagttggett ttcagatcag 720
caaggaatat gagcgcttct ctaaatacat gcccaatgtc aaggttgctg ttttttttg 780
tggctctgtc atcaagaagg atgaagaggt gctgaagaag aactgcccgc atatcgtcgt 840
ggggactcca ggccgtatcc tagccctggc tcgaaataag agcctcaacc tcaaacacat 900
taaacacttt attttggatg aatgtgataa gatgcttgaa cagctcgaca tgcgtcggga 960
tgtccaggaa atttttcgca tgacccccca cgagaagcag gtcagatgt tcagtgtac 1020
cttgagcaaa gagatccgtc cagtctgccg caagttcatg caagatccaa tggagatctt 1080

cgtggatgat gagacgaagt tgacgctgca tgggttgag cagtactacg tgaaactgaa 1140
 ggacaacgag aagaaccgga agctctttga ccttctggat gtccttgagt tcaaccaggt 1200
 ggtgatcttt gtgaagtctg tgcagcgggtg cattgccttg gccagctac tagtggagca 1260
 gaacttccca gccattgcca tccaccgtgg gatgccccag gaggagaggc tttctcggtg 1320
 tcagcagttt aaagattttc aacgacgaat tcttgtggct accaacctat ttggccgagg 1380
 catggacatc gagcgggtga acattgcttt taattatgac atgcctgagg attctgacac 1440
 ctacctgcat cgggtggcca gagcaggccg gtttggcacc aagggttggt ctatcacatt 1500
 tgtgtccgat gagaatgatg ccaagatcct caatgatgtg caggatcgct ttgaggtcaa 1560
 tattagttag ctgcctgatg agatagacat ctctctctac attgaacaga cacggtagaa 1620
 gactcgccca ttttggaatg tgaccgtctg tccttcagga gaggacacca ggggtgggggt 1680
 gaaggagaca ctactgcccc caccctgac agccccacc ccatggcttc catcttttgc 1740
 atcaccacca ctctgaacc cccatttctg atttgcaga attttttttt aacaaaacta 1800
 aaaatgaaac acatgtgtct gtggtatcta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1854

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

actcagccaa ggggtgcagag

20

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 10

cttcctcagg gattgagacc tc

22

<210> 11

<211> 121

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11

tccaaagcac gaagcacggg cagcccaagg agatggggca ggagagcctc acctgctgtg 60
cggagcccct gggcccgac gctcaggtcc ctttatagag gaagcggcag tggcagcgtg 120
g 121

<210> 12

<211> 121

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12

tccaaagcac gaagcacggg cagcccaagg agatggggca ggagagcctc acctgctgtg 60
tggagcccct gggcccgac gctcaggtcc ctttatagag gaagcggcag tggcagcgtg 120
g 121

<210> 13

<211> 121

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 13

agagaaaccc caaggtgagc agagggagac agagagagac aggaagggaa cagagaggaa 60
tcatggcaga aacagagaat gtgtgacaga gacaatgaga ctgacagatg gagagtcaga 120
g 121

<210> 14

<211> 121

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 14

agagaaaccc caaggtgagc agagggagac agagagagac aggaagggaa cagagaggaa 60
ccatggcaga aacagagaat gtgtgacaga gacaatgaga ctgacagatg gagagtcaga 120
g 121

<210> 15

<211> 121

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 15

tcacaccttc agctgcccag actgcccgtc agcaccacca gatgcatctt gccacagca 60
ccctcaaacc tgctgctcac ctcatggta aacatccacc tgacctcca gacatgtccc 120
c 121

<210> 16

<211> 121

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 16

tcacaccttc agctgcccag actgcccgtc agcaccacca gatgcatctt gccacagca 60
acctcaaacc tgctgctcac ctcatggta aacatccacc tgacctcca gacatgtccc 120
c 121

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 17

tttaaggctc aggagcccag 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 18

tccctgttgt tgtcccactg

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 19

atatcatgta cccggcagac

20

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 20

tggtctcac tcaactgttac gc

22

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 21

tcttcccgct cggattcag

19

<210> 22

<211> 121

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 22

aagcttacct aaacagggag agcgcgtatg gcggcagcaa cagcgacgaa ggagggaaat 60

gtgccttcac ttccggttgc aggtttccct ctactccagc ctcccgcctt cttggctgca 120

a

121

<210> 23

<211> 121

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 23

aagcttacct aaacagggag agcgcgtatg gcggcagcaa cagcgacgaa ggagggaaat 60

ctgccttcac ttccggttgc aggtttccct ctactccagc ctcccgctt ctgggtgca 120

a

121